

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NACHWEIS DER CHROMOSOMALEN INSTABILITÄT BEIM  
KOLOREKTALEN KARZINOM MITTELS FLOURESZENZ-IN-SITU-  
HYBRIDISIERUNG (FISH) UND KORRELATION MIT MOLEKULAREN  
UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dagmar Simone Stelzl

2009



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NACHWEIS DER CHROMOSOMALEN INSTABILITÄT BEIM  
KOLOREKTALEN KARZINOM MITTELS FLOURESZENZ-IN-SITU-  
HYBRIDISIERUNG (FISH) UND KORRELATION MIT MOLEKULAREN  
UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Dagmar Simone Stelzl

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Wolfgang Dietmaier

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Pompiliu Piso

Tag der mündlichen Prüfung:

29. April 2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das kolorektale Karzinom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
<b>1.2 Pathogenese und Molekularbiologie des kolorektalen Karzinoms.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Der CIN-Phänotyp .....	3
1.2.2 Der MSI-Phänotyp .....	6
1.2.3 MSI(-)/CIN(-)- und MSI(+)/CIN(+)-Karzinome.....	9
<b>1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Untersuchungsgut.....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Tumormaterial .....	11
2.1.2 Patienten .....	12
2.1.2.1 Klinische Daten .....	12
2.1.2.2 Pathologische Daten .....	12
2.1.2.3 Molekularbiologische Daten.....	14
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	15
2.2.1.1 FISH am Paraffingewebe.....	15
2.2.1.1.1 Vorbereitung des Materials für die FISH.....	15
2.2.1.1.1.1 Aufbau der Multiblocke und Anfertigung der Paraffinschnitte.....	15
2.2.1.1.1.2 Bestandteile des UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit.....	15
2.2.1.1.1.3 Verwendete Lösungen .....	17
2.2.1.1.2 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 1.....	18
2.2.1.1.2.1 Vorbereitung .....	18
2.2.1.1.2.2 Durchführung .....	19
2.2.1.1.3 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 2.....	20
2.2.1.1.3.1 Vorbereitung .....	20
2.2.1.1.3.2 Durchführung .....	20
2.2.1.2 FISH am Frischgewebe.....	21
2.2.1.2.1 Vorbereitung des Materials für die FISH.....	21
2.2.1.2.1.1 Herstellung der Touch-Präparate.....	21
2.2.1.2.1.2 Bestandteile des UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kits.....	22
2.2.1.2.1.3 Verwendete Lösungen .....	22
2.2.1.2.2 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 1.....	23
2.2.1.2.2.1 Vorbereitung des Präparates.....	23
2.2.1.2.2.2 Vorbereitung zum Färben .....	23
2.2.1.2.2.3 Fixierung der Zellen.....	24
2.2.1.2.2.4 Lyse und Sonde .....	24
2.2.1.2.3 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 2.....	25
2.2.1.2.3.1 Vorbereitung .....	25
2.2.1.2.3.2 Durchführung .....	25
2.2.2 Mikroskopische Auswertung der FISH-Präparate.....	26
2.2.2.1 Geräte und Einstellungen .....	26
2.2.2.2 Auswertungskriterien .....	27
2.2.2.2.1 Qualität des Präparates.....	27
2.2.2.2.2 Qualität und Quantität der Tumorzellen.....	27
2.2.2.3 Auszählen der Objektträger.....	29
2.2.2.3.1 Vorgehen .....	29
2.2.2.3.2 Dokumentation.....	30
2.2.3 Fotodokumentation der FISH-Präparate.....	30
2.2.3.1 Geräte und Einstellungen .....	30
2.2.3.2 Praktisches Vorgehen.....	31
2.2.4 PCR zum MSI-Nachweis .....	35

2.2.4.1 Praktisches Vorgehen.....	35
2.2.4.1.1 Reagenzien.....	35
2.2.4.1.2 Untersuchungsmaterial .....	35
2.2.4.1.3 Mikrodissektion .....	35
2.2.4.1.4 DNA-Isolierung.....	36
2.2.4.1.5 MSI-PCR 1.Panel.....	36
2.2.4.1.6 Vorbereiten der Fragmentanalyse für den ABI 3100/310 .....	37
2.2.4.1.7 Datenauswertung am Sequenzer.....	38
2.2.4.1.8 MSI-PCR 2.Panel .....	38
2.2.4.1.9 Vorbereitung der Fragmentanalyse für den ABI 3100/310.....	39
2.2.4.1.10 Datenauswertung am Sequenzer.....	39
2.2.4.1.11 Einzel-PCR.....	39
2.2.4.2 Befunden der PCR-Ergebnisse.....	41
2.2.5 Immunhistologie der Mismatchrepairgene.....	42
2.2.6 Molekularbiologische Daten .....	42
<b>2.3 Statistische Auswertung.....</b>	<b>43</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Patientengut.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Definition der CIN .....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Definition der CIN im Normalgewebe.....	45
3.2.2 Definition der CIN im Tumorgewebe .....	46
<b>3.3 CIN in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 CIN und Tumorstadium .....	54
3.3.2 CIN und Lymphknotenbefall.....	54
3.3.3 CIN und Tumorlokalisation.....	55
3.3.4 CIN und Differenzierungsgrad .....	55
3.3.5 CIN und Alter .....	56
3.3.6 CIN und Geschlecht.....	57
3.3.7 CIN und Überlebensrate .....	57
<b>3.4 CIN in Korrelation mit molekularen Markern.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 CIN und MS-Status .....	58
3.4.2 CIN und MS-Einzelmarker .....	62
3.4.2.1 BAT25, BAT26, BAT40.....	62
3.4.2.2 APC-d5s346 .....	62
3.4.2.3 APC-d5s1720.....	63
3.4.2.4 d2s123.....	63
3.4.2.5 d18s61.....	64
3.4.2.6 mfd15.....	64
3.4.2.7 TP53 .....	64
3.4.2.8 d18s58.....	64
3.4.2.9 d10s197 .....	65
3.4.2.10 d13s153 .....	65
3.4.2.11 mycl1.....	65
3.4.3 CIN und LOH der MS-Marker.....	66
3.4.4 CIN und Methylierung .....	67
3.4.5 CIN und Immunhistochemie von MLH1, MSH2 und MSH6.....	68
3.4.6 CIN und Maspin .....	69
3.4.7 CIN und CIMP-Pathway.....	69
3.4.8 CIN und $\beta$ -catenin .....	69
<b>3.5 CIN und p16(9p21) .....</b>	<b>70</b>
3.5.1 CIN und p16(9p21)-LOH.....	70
3.5.2 CIN und homozygote p16(9p21)-Deletion .....	72
<b>3.6 CIN und einzelne Centromermarker (CEP3, CEP7, CEP17, 9p21).....</b>	<b>72</b>
<b>3.7 Korrelationen der einzelnen Centromermarker.....</b>	<b>73</b>
3.7.1 CEP3.....	73
3.7.1.1 CEP3 und MS-Status.....	73
3.7.1.2 CEP3 und p16(9p21)-LOH .....	74

3.7.1.3 CEP3 und MS-Einzelmarker .....	74
3.7.1.4 CEP3 und $\beta$ -catenin.....	74
3.7.2 CEP7 .....	74
3.7.2.1 CEP7 und Grading .....	74
3.7.2.2 CEP7 und MS-Status.....	75
3.7.2.3 CEP7 und MS-Einzelmarker .....	75
3.7.2.4 CEP7 und MLH1 .....	75
3.7.2.5 CEP7 und $\beta$ -catenin.....	76
3.7.3 CEP17 .....	76
3.7.3.1 CEP17 und Tumorlokalisation .....	76
3.7.3.2 CEP17 und Grading .....	76
3.7.3.3 CEP17 und MS-Status.....	76
3.7.3.4 CEP17 und p16-LOH .....	77
3.7.3.5 CEP17 und MS-Einzelmarker.....	77
3.7.3.6 CEP17 und MLH1 .....	77
3.7.3.7 CEP17 und $\beta$ -catenin .....	77
3.7.4 p16(9p21) .....	77
3.7.4.1 p16(9p21) und klinisch-pathologische Parameter.....	78
3.7.4.2 p16(9p21) und MS-Status.....	78
3.7.4.3 p16(9p21) und p16(9p21)-LOH.....	78
3.7.4.4 p16(9p21) und MS-Einzelmarker.....	78
3.7.4.5 p16(9p21) und MLH1 .....	78
3.7.5 p16(9p21)-LOH und klinisch-pathologische Parameter .....	79
3.7.6 p16(9p21)-homozygote Deletion.....	80
<b>3.8 MS-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern .....</b>	<b>81</b>
3.8.1 MS-Status und Tumorstadium .....	82
3.8.2 MS-Status und Tumorlokalisation.....	82
3.8.3 MS-Status und Differenzierungsgrad .....	83
3.8.4 MS-Status und Geschlecht.....	84
<b>3.9 MS-Status in Korrelation mit molekularen Markern .....</b>	<b>84</b>
3.9.1 MS-Status und CEPs.....	84
3.9.2 MS-Status und p16(9p21).....	85
3.9.3 MS-Status und CIN-Status.....	85
3.9.4 MS-Status und Methylierung .....	86
3.9.5 MS-Status und Immunhistochemie von MLH1, MSH2 und MSH6.....	87
3.9.6 MS-Status und CIMP-Pathway.....	88
3.9.7 MS-Status und $\beta$ -catenin .....	89
<b>3.10 Deskription der FISH-Ergebnisse von Einzelfällen .....</b>	<b>89</b>
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>94</b>
5.1 Korrelation von CIN und MSI mit klinisch-pathologischen Parametern .....	94
5.2 Die verschiedenen Tumorgruppen .....	96
5.3 Die Rolle von MSI-low.....	102
5.4 Die Rolle von „CIN-low“ .....	104
5.5 Verschiedene Pathomechanismen bei Tumoren mit MSI und CIN.....	105
5.6 Neue Aspekte der Pathogenese beim CRC.....	107
5.7 Der CIMP (CpG island methylator phenotype)-Pathway .....	109
<b>6. Anhang .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>157</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>159</b>
<b>10. Erklärung.....</b>	<b>160</b>

<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>161</b>
----------------------------	------------



## **1. Einleitung**

### **1.1 Das kolorektale Karzinom**

#### **1.1.1 Epidemiologie**

Jedes Jahr erkrankt fast eine Million Menschen weltweit an Darmkrebs, wovon fast 50% innerhalb der nächsten fünf Jahre versterben (Weitz et al., 2005). In der BRD liegt die jährliche Neuerkrankungsrate bei 60.000 (Rüschhoff et al., 2004). Es handelt sich um einen Tumor des höheren Lebensalters, die Inzidenz nimmt ab dem 50. Lebensjahr stark zu (10/100.000 im 4. Lebensjahrzehnt vs. 400/100.000 im 8. Lebensjahrzehnt) (Greten, 2000). Das kolorektale Karzinom ist das zweithäufigste Malignom bei Frauen und das dritthäufigste bei Männern. Es ist für 15% der Krebstodesfälle verantwortlich (Greten, 2000).

Das Erkrankungsrisiko zeigt deutliche geographische Unterschiede: Es ist in Südafrika, Asien und Südamerika deutlich geringer als in den USA, Australien und Westeuropa (Hiddemann, 2004).

#### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Fast 80% der kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch, ohne ersichtlichen familiären Hintergrund. Bei einem kleinen Teil findet sich eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung als Erkrankungsursache und beim Rest scheinen Erbfaktoren die entscheidende Rolle zu spielen (Rüschhoff et al., 2004; Lichtenstein et al., 2000; Ricciardiello et al., 2003).

Umweltbedingte Faktoren, wie fleisch- und fettreiche Ernährung (Miller et al., 1983; Willett et al., 1990; Flenzel-Beyme 1991; Willet, 1989), gesteigerter Alkoholkonsum (Giovannucci et al., 1993; Wu et al., 1987; Bongaerts et al., 2007) und Übergewicht (Giovannucci et al., 1995; Moller et al., 1994) sind an der Entstehung der sporadischen Karzinome maßgeblich beteiligt. Etwa 15-20% der kolorektalen Karzinome sind erblich bedingt (zusammengefasst in Lynch et al., 1999) und entstehen teils im Rahmen von hereditären, autosomal-dominant vererbten Krebsyndromen: Eine Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen APC auf Chromosom 5q ist verantwortlich für die FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis coli), die ca. 1% der kolorektalen Karzinome ausmacht (Kinzler et al., 1991; Groden et al., 1991; Rüschhoff et al., 1998 und 2004). 5-8% der CRC treten im Rahmen des HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma)-Syndroms auf (zusammengefasst in Lynch et al., 1999). Ursache sind Mutationen in den Mismatchrepair-Genen (Peltomäki et al., 1997) hMSH2 (Fishel et al.,

1993; Leach et al., 1993) und hMLH1 (Papadopoulos et al., 1994). Der Ausfall eines dieser Gene führt zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), die bei ca. 80-90% der HNPCC-assoziierten Karzinome nachweisbar ist (Peltomäki et al., 1993a; Lothe et al., 1993; Aaltonen et al., 1993). Neben einer Reihe weiterer Syndrome, existieren auch abgeschwächte Formen der FAP und des HNPCC-Syndroms (Boland, 2004). Mutationen im MMR-Gen hMSH6 führen zum attenuierten HNPCC/Lynch-Syndrom (Hendriks et al., 2004), Mutationen im MYH-Gen zur attenuierten FAP (Wang L et al., 2004). Die hereditären kolorektalen Karzinome und die darin auftretenden Keimbahnmutationen haben maßgeblich zur Etablierung des ursprünglichen Modells der Tumorgenese beim kolorektalen Karzinom beigetragen.

## **1.2 Pathogenese und Molekularbiologie des kolorektalen Karzinoms**

Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus Adenomen im Rahmen der Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz durch die sequentielle Akkumulation genomischer Läsionen. Krebs ist sozusagen das Resultat einer Anhäufung von genetischen Alterationen, welche neoplastischen Zellen erlauben, zu proliferieren. Verschiedene Prozesse wie verstärkte Wachstumssignale, Resistenz gegenüber Anti-Wachstumssignalen, Vermeidung von Apoptose, unlimitiertes Wachstumspotential, verstärkte Angiogenese und die Fähigkeit, invasiv zu wachsen und zu metastasieren, sind daran beteiligt (Hahn et al., 2002; Hanahan et al., 2000). Die Entwicklung von einem Adenom zu einem Karzinom kann Jahrzehnte lang dauern. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Aktivierung von Onkogenen, wie KRAS (Vogelstein et al., 1988) und c-myc (Sikora et al., 1987), in Kombination mit einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie APC (Fearon et al., 1990; Vogelstein et al., 1988; Gryfe et al., 1997).

Sporadische kolorektale Karzinome scheinen über erworbene somatische Mutationen in verschiedenen Genen zu entstehen, wovon manche identisch mit denen sind, die bei hereditären Karzinomen betroffen sind. Dennoch kann die Rate an erworbenen Mutationen alleine nicht für die Vielzahl an genetischen Alterationen verantwortlich gemacht werden, die sich in den meisten Tumoren finden (Loeb et al., 2003). Dies führte zu der Annahme, dass eine Destabilisierung des Genoms eine Voraussetzung ist, die früh in der Karzinogenese auftritt (Loeb et al., 2001).

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms werden zwei Pathomechanismen unterschieden: der CIN- und der MSI-„Pathway“, welche zwei verschiedene Arten der genetischen Instabilität widerspiegeln (Grady et al., 2000; zusammengefasst in Söreide et al., 2006). Die Entdeckung dieser beiden verschiedenen Pathomechanismen hat dazu geführt, dass das

kolorektale Karzinom als eine genetisch sehr heterogene Erkrankung betrachtet wird, (Gervaz et al., 2004; Jass et al., 2002a; Sugai et al., 2005) bei der viele verschiedene Gene entweder einzeln oder gleichzeitig mutiert sein können. Die Gene, die ursprünglich von Fearon und Vogelstein im mutierten Zustand als maßgeblich für die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen identifiziert wurden, wie APC, Gene auf 18q, KRAS und das TP53-Gen (Fearon et al., 1990), wurden im Laufe der Zeit um einige weitere Gene ergänzt (Huang et al., 1996; Kinzler et al., 1996; Lengauer et al., 1997a; Liu et al., 1996; Parsons et al., 1993). Immer mehr verlor man den Gedanken, dass für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms eine in genauer Reihenfolge ablaufende Kaskade von exakt definierten Gen-Mutationen benötigt wird. Vielmehr wurde es offensichtlich, dass eine Vielzahl von alternativen Pathomechanismen existiert, die zur Entstehung eines Tumors führen können.

### **1.2.1 Der CIN-Phänotyp**

Der Großteil der kolorektalen Karzinome, nämlich fast 85%, zeigt eine Instabilität auf dem chromosomalen Level, welche durch Allelverluste, LOH (loss of heterozygosity), Chromosomen-Amplifikationen und -Translokationen sowie strukturelle Chromosomenveränderungen gekennzeichnet ist (Kinzler et al., 1991; Lengauer et al., 1998; Haydon et al., 2002; Jass et al., 2002a; Jass et al., 2002b; Choi et al., 2002; Giaretti et al., 2000; Hermsen et al., 2002; Kennedy et al., 1998; Liu et al., 1995b; Meijer et al., 1998; Postma et al., 2005).

Bereits 1914 stellte Boveri fest, dass viele Karzinome aus Zellen mit einem anormalen Chromosomengehalt bestehen (Boveri, 1914). Obwohl die Existenz des „CIN-Phänotyp“ seit langem bekannt ist, bleibt die molekulare Basis bis heute unklar (Wang Z., et al., 2004; Hadjihannas et al., 2006).

Häufig wird chromosomale Instabilität mit Aneuploidie gleichgesetzt. Aneuploidie ist ein Status, ein bestimmter Zustand, der durch einen anormalen Chromosomengehalt gekennzeichnet ist (Lengauer et al., 1997). Die CIN (chromosomale Instabilität) dagegen steht für erhöhte Raten von chromosomalen Veränderungen, die in den Zellen akkumulieren. Das heißt, Zellen von CIN-Karzinomen zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen oder solchen von nicht CIN-Karzinomen deutlich erhöhte Verlust- und/oder Gewinn-Raten von ganzen Chromosomen oder von großen Teilen derselben (Lengauer et al., 1997). CIN und Aneuploidie sind streng miteinander assoziiert (Miyazaki et al., 1999). Ob Aneuploidie jedoch der verursachende Faktor oder nur eine simple Konsequenz der Tumorgenese ist, wird kontrovers beurteilt (Li et al., 2000). Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Aneuploidie in Karzinomen

eine zugrunde liegende CIN widerspiegelt (Hartwell, 1992; Hartwell et al., 1994; Lengauer et al., 1997 a; Nowak et al., 2002).

Methylierungs-Defekte scheinen maßgeblich an der Entwicklung des CIN-Phänotyps beteiligt zu sein und bei der Chromosomenteilung in Karzinomzellen eine entscheidende Rolle zu spielen (Lengauer et al., 1997 b; Schmid et al., 1983; Schmid et al., 1984).

Über ein „Durcheinander der mitotischen Vorgänge in malignen Epithelgeschwülsten“ als Ursache der Krebsentstehung berichtete Hanseman bereits 1890 in seiner Arbeit „Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung“. Gene, die mit der molekularen Basis von CIN in Verbindung gebracht werden, sind in verschiedene Prozesse, vor allem im Rahmen der Zellteilung involviert: Chromosomen-Kondensation, Schwester-Chromatid-Kohäsion, Kinetochoren-Struktur und -Funktion, Zentrosomen-/ Mikrotubuli-Formation und -Dynamik und Checkpunkt-Gene, die den regelrechten Ablauf des Zellzyklus überwachen (zusammengefasst in Lengauer et al., 1998).

Der Funktionsverlust eines Mitose- (oder Spindel-) Checkpunkts, der durch eine mutationsbedingte Inaktivierung des BUB1 und/oder BUBR1-Gens hervorgerufen werden kann, ist eine mögliche Ursache für die CIN (Grady, 2004). Im Gegensatz zu MSI-Zelllinien gelingt es bei CIN-Zelllinien nicht, bei einem zerstörten Spindelcheckpunkt die Zellteilung zu stoppen (Cahill et al., 1998).

Allerdings kann ein zerstörter Spindelcheckpunkt nicht die einzige Ursache von CIN sein, da auch in aneuploiden kolorektalen Karzinomen ein stabiler Spindelcheckpunkt nachgewiesen werden konnte und von anderen Gruppen gezeigt werden konnte, dass auch CIN-Zellen die Zellteilung einstellen können, wenn das Spindelsystem zerstört wird (Tighe et al., 2001).

Veränderte Zentrosomen stellen einen weiteren Mechanismus dar, über den sich eine Aneuploidie entwickeln kann (Boveri, 1914). Dabei scheinen verschiedene Mechanismen beteiligt zu sein: die Aurora-Kinasen (Katayama et al., 2003), insbesondere die Kinase Aurora 2/STK 15 (Bischoff et al., 1998; Dutertre et al., 2002; Gerlach et al., 2006; Nishida et al., 2007), weitere Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) wie Polo und NimA (Nigg, 2001), der Cdk2-cyclin E (Cdk2-E)-Komplex (Simone et al., 2002), Cdk2-Inhibitoren, wie zum Beispiel die Proteine p21 und p27 (Pennisi, 1999; Hershko et al., 2006), die MPS1-Familie (Winey et al., 2002) und eine TP53-Inaktivierung (Lengauer et al., 1998; Tarapore et al., 2002).

Zentrosomen-Amplifikationen und CIN treten nur in aneuploiden Tumoren und Zelllinien auf, während diploide Tumoren Zentrosomen enthalten, die funktionell und strukturell normal sind (Ghadimi et al., 2000; Lingle et al., 1998, 2002). Es existieren verschiedene Wege, die zu Zentrosomen-Defekten und somit zur genetischen Instabilität führen. Eine Zentrosomen-

Amplifizierung ist ein möglicher ursprünglicher Grund für eine CIN und tritt vor allem bei rezidivierenden und aggressiven Tumoren auf (D'Assoro et al., 2002).

Weitere molekulare Ursachen der CIN finden sich auf der Ebene von S-Phase-Checkpunkten, Rekombinationsmechanismen und Telomerendysfunktion (zusammengefasst in Kolodner et al., 2002, Nasmyth, 2002; Maser et al., 2002).

Der Verlust des hSecurin-Gens, das in die Chromosomenteilung während der Anaphase involviert ist, wird ebenfalls mit der Entstehung von CIN-Karzinomen in Verbindung gebracht (Jallepalli et al., 2001).

Mutationen in hCDC4, einer Ligase, die vermutlich in die Regulation des G1-S-Zellzyklus-Checkpunkts involviert ist bzw. dessen Inaktivierung können eine chromosomale Instabilität sowohl in kolorektalen Karzinomen als auch in deren Vorläufern hervorrufen (Rajagopalan et al., 2004; Nishida et al., 2007). Kemp et al. fanden allerdings keine Assoziation zwischen CDC4-Mutationen und CIN in CRC.

Mutationen in MRE11, dessen Produkt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, Mutationen in hZw10, hZwilch/FLJ10036 und hRod/KNTC1, deren Produkte zusammen einen Komplex bilden, der an Kinetochoren bindet und die Chromosomenteilung kontrolliert und Mutationen in Ding, das ähnliche Mechanismen beeinflussen könnte wie hSecurin, werden ebenfalls für die genetische Basis von CIN verantwortlich gemacht (Wang Z et al., 2004). Das Tumorsuppressorgen APC führt über den Wnt-Pathway zur Downregulierung der  $\beta$ -catenin abhängigen Transkription von Zellproliferations-Genen (zusammengefasst in Fearnhead et al., 2001; van Es et al., 2001). Viele kolorektale Karzinome haben entweder eine Mutation des APC-Gens oder von  $\beta$ -catenin (Salahshor et al., 1999; Lamlum et al., 2000). Bei MSI-Zellen ist APC, im Gegensatz zu CIN-Zellen, meist nicht mutiert (Salahshor et al., 1999; Cahill et al., 1999, Rowan et al., 2000). APC-Mutationen können über die Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalkette zur Up-Regulation von conductin/AXIN2 während der Mitose führen und durch die Bindung von conductin an die polo-like Kinase 1, CIN verursachen (Hadjihannas et al., 2006). Zusammengefasst beweisen diese Ergebnisse das APC eine kausale Rolle bei der Entstehung von CIN spielt (Tighe et al., 2001).

Wie Lengauer et al. bereits 1998 vermuteten, spricht vieles dafür, dass genetische Defekte in vielen verschiedenen Genen zu CIN führen können und eine heterogene Basis zu Grunde liegt. Gene die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, Kinetochoren-Funktion und Chromosomenteilung verantwortlich sind, scheinen hauptsächlich betroffen und damit für die Entwicklung einer Aneuploidie verantwortlich zu sein (Lengauer et al., 1998 und Wang Z et al., 2004).

Einige Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte sind häufig in CIN-Karzinomen verändert: 75% der kolorektalen Karzinome zeigen LOH der Chromosomen 17p und 18q, 50% zeigen LOH auf Chromosom 5q (Vogelstein et al., 1988; Herbergs et al., 1996). Auf Chromosom 5 q liegen die Tumorsuppressorgene APC und MCC (mutated in colorectal carcinoma) (Grodén et al., 1991; Kinzler et al., 1991), auf Chromosom 18q das Tumorsuppressorgen DCC (deleted in colorectal carcinoma) sowie DPC4/SMAD4 (deleted in Pancreatic Cancer 4) und SMAD2 (Fearon et al., 1990; Woodford-Richens et al., 2001). Eine Mutation oder ein Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 (17p13) findet sich bei der Mehrzahl der kolorektalen Karzinome (Baker et al., 1989). Beim CIN-Phänotyp treten TP53-Mutationen häufiger auf als beim MSI-Phänotyp (Cottu et al., 1996; Eshleman et al., 1998). Eine häufige numerische Veränderung bei kolorektalen Karzinomen ist die Trisomie von Chromosom 7 (Bardi et al., 1993; Herbergs et al., 1996).

Aneuploide Tumoren sind gekennzeichnet durch ein erhöhtes Alter der Patienten, eine erhöhte angiolymphatische Invasion, eine erniedrigte 5-Jahres-Überlebensrate und ein fortgeschrittenes Dukes Stadium (Murelis et al., 1990; Visscher et al., 1990; Witzig et al., 1991; Tsuchiya et al., 1992; Lanza et al., 1998). Massive chromosomale Veränderungen finden sich vor allem bei schlecht differenzierten Karzinomen (Bardi et al., 1993; Lanza et al., 1998). Kombiniert man den Ploidiegrad mit dem Dukes Stadium lassen sich signifikante Aussagen bezüglich des Rezidivrisikos treffen (Pietra et al., 1998; Flyger et al., 1999).

### **1.2.2 Der MSI-Phänotyp**

10-15% der sporadischen und mehr als 90% der HNPCC-assoziierten kolorektalen Karzinome weisen eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) auf (Aaltonen et al., 1993; Thibodeau et al., 1993; Kim et al., 1994). Solche Tumoren zeigen Leseraster- (Frameshift-) Mutationen und Substitutionen von Basenpaaren, die sich häufig in kurzen, repetitiven Nukleotidsequenzen, bekannt als Mikrosatelliten, finden (Liu et al., 1996; Aquilina et al., 1994; Jass et al., 1995; Perucho et al., 1996; Thibodeau et al., 1993).

Diese Form der genetischen Instabilität entsteht meist durch den Verlust der DNA-Mismatch-Repair-Funktion, entweder durch Mutation (Strand et al., 1993; Fishel et al., 1995) oder Promotor-Methylierung (Herman et al., 1998) von DNA-MMR-Genen, vorwiegend von dem MutL-Homologen, hMLH1 (Papadopoulos et al., 1994) seltener von dem MutS-Homologen, hMSH2 (Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993) oder noch seltener von hMSH6, hMSH3, hPMS2 und hPMS1. Keimbahnmutationen dieser Gene treten vor allem beim HNPCC-Syndrom auf (Kinzler et al., 1996; Papadopoulos et al., 1997). Bei sporadischen Karzinomen

mit MSI treten Mutationen der MMR-Gene seltener auf (Liu et al., 1995; Moslein et al., 1996; Cunningham et al., 1998) und falls doch vorwiegend bei jüngeren Patienten (Liu et al., 1995b). Hier erklärt man sich den Pathomechanismus über „epigenetic silencing“: Eine bi- oder hemi-allelische Methylierung von Cytosin-Resten des Cytosin- und Guanin (CpG)-reichen Promoters von MLH1 führt zu einer Downregulation der Transkription und folglich zu defekten Proteinen (Kane et al., 1997; Herman et al., 1998; Wheeler et al., 2000; Herman et al., 2003; Miyakura et al., 2004). Dies resultiert in einer negativen immunhistochemischen Proteinexpression (Thibodeau et al., 1996; Strazzullo et al., 2003). Die Mehrzahl der Karzinome zeigt eine fehlende hMLH1-Proteinexpression (Thibodeau et al., 1998; Deng et al., 2002). Promotorhypermethylierung und fehlende immunhistochemische hMLH1- oder, sehr viel seltener, hMSH2-Expression sind signifikant mit dem MSI-high Phänotyp in CRCs assoziiert (Arnold et al., 2004).

Mittels quantitativen MLH1-Methylierungs-Analysen lassen sich sporadische MSI-high-CRC von HNPCC assoziierten unterscheiden (Bettstetter et al., 2006, 2007 und 2008).

Der „CpG island methylator phenotype“ (CIMP) scheint ein ausschlaggebender Event in etwa der Hälfte von allen sporadischen kolorektalen Karzinomen zu sein (Toyota et al., 1999). CIMP-positive kolorektale Karzinome sind durch bestimmte pathologische, klinische und molekulargenetische Eigenschaften gekennzeichnet (Toyota et al., 1999; Liu et al., 2004; Lind et al., 2004; van Rijnsoever et al., 2002). Auch andere Mechanismen können zum Verlust eines MMR-Proteins führen; für hMSH2 ist keine Promotorhypermethylierung bekannt (Herman et al., 1998; Cunningham et al., 1998).

Einfach gesagt wird über diesen epigenetischen Mechanismus die Genfunktion verändert und nicht das Gen an sich. Dies geschieht durch abnorme DNA-Methylierung, was das Gen oder die Gen-Region daran hindert, transkribiert zu werden, das Gen also „stilllegt“ und so einen Defekt bei der Proteinexpression bewirkt (Kondo et al., 2004; Mori et al., 2004).

Normal funktionierende MMR-Gene erkennen und reparieren Nukleotid-Fehlpaarungen (Mismatches), die im Rahmen der DNA-Replikation auftreten (Modrich, 1991). Geht die MMR-Funktion verloren, spricht man von „replication error positive“ (RER+). Dieser Zustand führt insbesondere in einfach repetitiven DNA-Sequenzen (vor allem (A)<sub>n</sub>- und (CA)<sub>n</sub>-Repeats), den Mikrosatelliten, die sich in einer großen Zahl über die gesamte DNA-Sequenz verteilt finden und aufgrund ihrer repetitiven Natur besonders anfällig für Veränderungen während der Replikation sind, zu einer Akkumulation von Fehlern. Es entstehen Längenpolymorphismen, so dass die PCR-Produkte aus Kolonkarzinom-DNA Veränderungen im Vergleich zur Normalgewebe-DNA zeigen, was man als Mikrosatelliten-Instabilität bezeich-

net (Peinado et al., 1992; Aaltonen et al., 1993; Peltomäki et al., 1993b; Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist also ein Zustand, bei dem ein Keimbahn Mikrosatelliten-Allel repetitive Sequenzen gewonnen oder verloren hat und somit einer somatischen Längenveränderung unterlegen hat. Mit PCR kann man diesen Zustand nur dann detektieren, wenn viele Zellen von der gleichen Veränderung betroffen sind und damit ist die Mikrosatelliteninstabilität ein Indikator für klonale Expansion, was typisch für Karzinome ist.

Meist sind die Mikrosatelliten in nicht-kodierenden DNA-Sequenzen gelegen, teilweise kommt es aber auch innerhalb repetitiver Sequenzen bestimmter Gene (Jung et al., 2006), wie TGF $\beta$ RII (transforming growth factor  $\beta$  type II receptor) (Parsons et al., 1995; Markowitz et al., 1995), IGFIR (insulin-like growth factor II receptor) (Souza et al., 1996), BAX (Rampino et al., 1997) und TCF-4 (T-cell factor 4) (Duval et al., 1999; Ruckert et al., 2002), welche für Zellproliferation und/oder Apoptose mitverantwortlich sind, zu Mutationen, was wiederum zur Tumorgenese führt (Toft et al., 1998).

Oft finden sich auch Alterationen von  $\beta$ -catenin, gelegentlich zeigen sich p16INK4A und PTEN auf 10q23 (= phosphatase and tensin homologue) durch Promotorhypermethylierung verändert (Goel et al., 2004). Weitere Gene, die MSI zeigen, sind GRB-14, RHAMM, RAD50 und BLM (Duval et al., 2001; Kim et al., 2001) sowie MARCKS, FLJ11383 und TAF1B (Kim et al., 2002). In MSI-Tumoren treten Mutationen in vielen Genen an variablen Sequenzen auf. Einerseits können über die Akkumulation solcher Alterationen onkogene Effekte entstehen, andererseits sind viele Gene betroffen, die keine Rolle in der MSI-Karzinogenese spielen und nur „zufällig“ im Rahmen des hohen Instabilitätsmaßes verändert sind (Duval et al., 2002; Ruckert et al., 2002).

Für hMLH1 und hMSH2 konnte gezeigt werden, dass sie bei Überexpression Apoptose induzieren können. hMLH1- bzw. hMLH2-defekte Karzinome können sich über einen Verlust der Apoptosefähigkeit entwickeln (Zhang et al., 1999).

In den Richtlinien des National Cancer Institute (NCI) wurde für die MSI-Analyse ein „international reference primer panel“ von fünf Mikrosatellitenmarkern, bestehend aus zwei Mononukleotid-Repeats (BAT25 und BAT26) und drei Dinukleotid-Repeats (D2S123, D5S346 und D17S250) festgelegt. Danach kann man Karzinome in drei Gruppen einteilen: MSI-high-Tumoren weisen in mehr als 30-40%, also in mindestens zwei der fünf Marker eine Instabilität auf, MSI-low-Tumoren zeigen in weniger als 30-40% der Marker eine Instabilität und MSS (Mikrosatellitenstabile)-Tumoren zeigen keine Instabilität (Boland et al., 1998; Dietmaier et al., 1997). Wenn man mehr als diese fünf Marker untersucht, zeigen beinahe alle



kolorektalen Tumoren einen gewissen Grad an Instabilität, meist MSI-low (Laiho et al., 2002). Die strikte Trennung von MSS- und MSI-low-Tumoren (Jass et al., 2002c) wird deshalb kontrovers beurteilt (Tomlinson et al., 2002; Halford et al., 2003).

Sporadische MSI-high-Tumoren und HNPCC assoziierte Karzinome weisen hinsichtlich Klinik und Pathologie eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf: Im Gegensatz zu MSS-Tumoren handelt es sich um große, meist diploide Karzinome, die selten LOH und Mutationen in Genen wie TP53, APC und KRAS zeigen und im proximalen Kolon liegen (Thibodeau et al., 1993; Aaltonen et al., 1993; Peltomäki et al., 1993a; Ionov et al., 1993; Cottu et al., 1996; Tou et al., 2004; Rajagopalan et al., 2002; Chang et al., 2006). Sie zeigen häufig einen geringen Differenzierungsgrad mit muzinösen Anteilen, ein medulläres Wachstumsmuster und eine intratumorale Lymphozytose. Sie werden mit seltener auftretenden Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einer günstigeren Prognose assoziiert (Lothe et al., 1993; Kim et al., 1994; Boland et al., 1998; Rüschhoff et al., 1997; Lanza et al., 1998; Lim et al., 2004; Gryfe et al., 2000; Kohonen-Corish et al., 2005; Popat et al., 2005; Ribic et al., 2003; Wright et al., 2005). Durch den Nachweis von BRAF V600E-Mutationen unterscheiden sich die sporadischen CRC mit Mikrosatelliteninstabilität von den HNPCC-Fällen, bei welchen diese Mutation nicht vorkommt (Bettstetter et al., 2007).

### **1.2.3 MSI(-)/CIN(-)- und MSI(+)/CIN(+)-Karzinome**

Lange Zeit wurde angenommen, dass es nur den CIN- und den MSI-Pathomechanismus gibt, und dass sich alle kolorektalen Karzinome entweder dem einen oder dem anderen zuordnen lassen. Zeigte sich keine MSI, waren die Tumoren also MSS, ließen sich Gewinne oder Verluste von ganzen Chromosomen oder großen Teilen derselben nachweisen (Schlegel et al., 1995; Cottu et al., 1996; Lengauer et al., 1997a; Eshleman et al., 1998; Lengauer et al., 1998; De Angelis et al., 1999; Curtis et al., 2000). In verschiedene Studien fand sich ein Anteil (20-40%) an kolorektalen Karzinomen, die weder dem CIN- noch dem MSI-Phänotyp zugeordnet werden konnten (Yao et al., 1999; Georgiades et al., 1999). Diese mikrosatellitenstabilen, diploiden Karzinome, auch als MACS (= microsatellite and chromosome stable) bezeichnet, scheinen sich phänotypisch von anderen zu unterscheiden und werden mit dem früheren Auftreten von Metastasen assoziiert (Hawkins et al., 2001; Chan et al., 2001; Goel et al., 2003; Tang et al., 2004). Ein kleiner Teil von MSI-high-Karzinomen zeigt zusätzlich LOH an verschiedenen Chromosomen, lässt sich also gleichzeitig dem CIN-Phänotyp zuordnen (Goel et al., 2003; Li et al., 2003). Über welche Mechanismen die Tumoren dieser beiden Untergruppen entstehen, ist bisher noch unbekannt.

### **1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) lassen sich chromosomale Veränderungen und eine Aneuploidie in Karzinomen nachweisen (Devilee et al., 1988; Hopman et al., 1991a+b; Taylor et al., 1994; Hartmann et al., 1999; Obermann et al., 2003). Daher findet dieses Verfahren auch bei der Untersuchung kolorektaler Karzinome seine Anwendung (Sasaki et al., 1995; Herbergs et al., 1996; Lengauer et al., 1997a).

Die Fähigkeit einzelsträngiger Nukleinsäuren (DNA oder RNA) mit komplementärer Basensequenz, sich zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammen zu lagern, liegt der FISH zu Grunde. Es entsteht eine Hybrid-DNA, die aus einer markierten DNA-Probe und dem dazu komplementären Ziel-DNA-Strang besteht (Cremer et al., 1995).

Bei der indirekten FISH liegt eine Haptenmarkierung der DNA-Probe vor, die erst sekundär durch einen Fluoreszenzmarker, wie z.B. einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, sichtbar gemacht werden kann. Bei der direkten FISH wird die DNA-Probe unmittelbar mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Demetrick, 1995; Cremer et al., 1995).

Die FISH ist ein weltweit verbreitetes diagnostisches Verfahren, mit dem individuelle Chromosomen und Chromosomenabschnitte im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Auch einzelne Gene können dargestellt werden (Shapiro et al., 1993; Sauter et al., 1994). Im Gegensatz zur klassischen Zytogenetik kann die FISH unabhängig vom Stadium des Zellzyklus angewendet werden. Individuelle Chromosomen und Gene werden auch in Zellkernen sichtbar gemacht, die sich in der Interphase befinden.

Die Einsatzmöglichkeiten reichen vom Nachweis numerischer Chromosomenveränderungen in der Pränataldiagnostik bis hin zur Erfassung spezifischer Chromosomenveränderungen in Krebszellen (Cremer et al., 1995). Eine gute Illustration hierfür ist die Visualisierung der bcr/c-abl Translokation, welche das in den meisten Fällen der CML vorliegende Philadelphia-Chromosom entstehen lässt (Tkachuk et al., 1990).

Eine weitere wichtige Verwendung findet die FISH bei der Zuordnung von Genen zu ihrer chromosomalen Lokalisation (Demetrick, 1995). So konnte das auch in dieser Arbeit mit untersuchte p16-Gen der Chromosomenposition 9p21-22 zugeordnet werden und erwies sich als potentiell Tumor-suppressorgen, das häufig homozygote oder heterozygote Deletionen aufweist (Kamb et al., 1994; Nobori et al., 1994; Okamoto et al., 1994).

Mittels FISH kann nicht nur die mittlere Zahl von Amplifikationen bestimmter Gene in einem Tumor bestimmt werden, sondern individuelle Zellen unterschiedlichster Morphologie diesbezüglich beurteilt werden (Kallioniemi et al., 1992).

Die zwei-Farben-FISH ist eine schnelle und sensitive Methode, um Deletionen der Chromosomenregion 17p, wo auch das Tumorsuppressorgen TP53 lokalisiert ist, darzustellen. Durch gleichzeitige Hybridisierung sowohl der pericentromerischen Chromosomenregion als auch des spezifischen Lokus 17p13.1, gelingt es Deletionen festzustellen, die mit anderen Methoden aufgrund gleichzeitig vorhandener Aneuploidie nicht erkannt würden (Matsumura et al., 1992).

Neben Zellkulturen (Lengauer et al., 1997a) und Paraffinschnitten (Thompson et al., 1993) eignen sich auch Feinnadelaspirate, Frischgewebe und Gefriermaterial für die FISH (Demetrick et al., 1996).

## **1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

In dieser Arbeit wurden kolorektale Karzinome mit FISH untersucht, um numerische Veränderungen der Chromosomen drei, sieben und 17 sowie der Gen-Region p16 auf Chromosom neun beurteilen zu können. Klinisch-pathologische und molekulare Parameter, insbesondere der MS-Status waren bei Durchführung der FISH nicht bekannt. Ziel war es, die Karzinome je nach gefundener Signalzahl der Centromermarker in verschiedene Gruppen einzuteilen. Wie viele Gruppen sich dabei ergeben und wie die Ergebnisse der FISH mit klinisch-pathologischen und molekularen Daten, vor allem mit dem durch PCR-Analyse festgelegtem MS-Status korrelieren, galt es, in dieser Arbeit zu ermitteln. Von besonderem Interesse war die Frage, ob sich neben dem CIN- und dem MSI-Phänotyp weitere Untergruppen zeigen und ob diese mit bestimmten klinisch-pathologischen oder molekularbiologischen Eigenschaften in Verbindung gebracht werden können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsgut**

#### **2.1.1 Tumormaterial**

In dieser Arbeit wurden kolorektale Karzinome von 50 Patienten untersucht. Zu jedem Karzinom gab es eine korrespondierende Normalmukosa, die aus gesundem Darmgewebe gewonnen worden war. Alle Patienten hatten sich zwischen 1996 und 2002 in der chirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg einer Operation unterzogen.

Für die Untersuchungen stand sowohl Paraffinmaterial (n=35) als auch Gefriermaterial (n=50) zur Verfügung.

### **2.1.2 Patienten**

Diese Arbeit schloss 50 Patienten ein, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren. Von diesem Kollektiv standen klinische, pathologische und molekularbiologische Daten zur Verfügung.

#### **2.1.2.1 Klinische Daten**

Die 50 Patienten wurden unabhängig von ihrer Familienanamnese in die Studie eingeschlossen. Neben sporadischen Karzinomen fanden sich auch solche, die im Rahmen einer familiären Prädisposition, etwa im Rahmen eines HNPCC-Syndroms, auftraten.

Elf Patienten hatten eine Chemotherapie und vier eine Radiatio erhalten. Auch diese Kriterien spielten für den Einschluss in die Studie keine Rolle.

Somit wurden 21 Frauen (42%) und 29 Männer (58%) in die Studie aufgenommen. Alle waren im Alter zwischen 27 und 89 Jahren als sie sich der Operation unterzogen. Im Mittel lag das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt bei 64 Jahren (Median) (Mittelwert: 63,32 Jahre).

Bezüglich des Krankheitsverlaufes standen die Daten des Tumorzentrums zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde der Datenstand von Januar 2004 verwendet. Die darin dokumentierte Überlebensrate bezog sich auf den 30.09.2003.

Zu diesem Zeitpunkt waren noch 32 Patienten (64%) am Leben und 18 Patienten (36%) bereits verstorben. Bei drei Patienten war im Verlauf ein Rezidiv aufgetreten, woran zwei verstarben.

Weitere klinische Daten wie Risikofaktoren, Familienhäufungen und frühere Tumorerkrankungen waren von einem Teil der Patienten bekannt. Für alle Patienten war eine Einteilung nach den Bethesda Kriterien erfolgt.

#### **2.1.2.2 Pathologische Daten**

Ein Staging aller Patienten war nach dem TNM-System erfolgt. Allgemein erfolgt die TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms heute nach der 6. Auflage der UICC von 2003: „T“ beschreibt dabei den Primärtumor, „N“ die regionären Lymphknoten und „M“ die Fernmetastasen.

TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (UICC:TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage 2003)	
Einteilung	Beschreibung
<b><i>T - Primärtumor</i></b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ <sup>a</sup>
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes perikolisches oder perirektales Fett
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen <sup>b</sup> und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<b><i>N - Regionäre Lymphknoten<sup>c</sup></i></b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0 <sup>d</sup>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b><i>M - Fernmetastasen</i></b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<sup>a</sup> Tumorzellen sind innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial) oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist. <sup>b</sup> Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z. B. die Infiltration des Sigmas durch ein Zäkalkarzinom. <sup>c</sup> Regionäre Lymphknoten sind die perikolischen oder perirektalen Lymphknoten und jene entlang den Aa. ileocolica, colica dextra, colica media, colica sinistra, mesenterica inferior, rectalis (haemorrhoidalis) superior und iliaca interna. <sup>d</sup> pN0: Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 12 oder mehr Lymphknoten.	

**Tab.1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms; aus Hiddemann, Huber, Bartram: „Die Onkologie“; Teil 2; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2004**

Durch ein histopathologisches Grading gelingt es, den Differenzierungsgrad kolorektaler Karzinome festzulegen.

Histopathologisches Grading (Differenzierungsgrad) des kolorektalen Karzinoms	
Grad	Beschreibung
GI	Gute Differenzierung: Ein Karzinom mit histologisch und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel sehr ähnlich sind
GII	Mäßige Differenzierung: Ein Karzinom, das im Differenzierungsmuster zwischen GI und GIII einzuordnen ist
GIII	Schlechte Differenzierung: Ein Karzinom mit histologischen und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel kaum ähneln (mindestens eine Drüsenformation oder Schleimproduktion muss erkennbar sein)
GIV	Undifferenziert: Es lassen sich kleine glanduläre oder plattenepitheltypische Differenzierungsmuster erkennen (beim kolorektalen Karzinom nur für undifferenzierte und kleinzellige Karzinome anwendbar)
Bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden erfolgt eine Einstufung nach niedrigstem Differenzierungsgrad. GI und GII werden auch als „low grade“; GIII und GIV als „high grade“ zusammengefasst.	

**Tab.2: Histopathologisches Grading des kolorektalen Karzinoms; aus Hiddemann, Huber, Bartram: „Die Onkologie“; Teil 2; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2004**

Neben diesen histopathologischen Kriterien waren natürlich auch makroskopische Merkmale der Tumore von Bedeutung.

Bei der Lokalisation wurde zwischen rechts- und linksseitig gelegenen Karzinomen unterschieden. Rechts entspricht proximal und ist per Definition rechts der linken Flexur gelegen. Distale, auch als linksseitig bezeichnete, Karzinome schließen also Rektum, Kolon sigmoideum und Kolon descendens ein; proximale sind im Kolon transversum, Kolon ascendens oder Caecum lokalisiert.

### **2.1.2.3 Molekularbiologische Daten**

Von allen 50 Patienten wurde mittels PCR-Analyse der MS-Status ermittelt. Bei je unterschiedlich vielen Patienten waren außerdem folgende Parameter bestimmt worden: Immunhistochemische Expression der MMR-Proteine hMLH1, hMSH2 und hMSH6 sowie

von Maspin, Promotormethylierung von hMLH1, p14, p15 und p16, der CIMP-Pathway und  $\beta$ -catenin-Akkumulation im Zellkern.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgte die Aneuploidie-Beurteilung der kolorektalen Karzinome.

#### **2.2.1.1 FISH am Paraffingewebe**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sollte ursprünglich an Paraffingewebeproben durchgeführt werden. Dazu wurden sogenannte Multiblocke verwendet, die Gewebeproben von bis zu 60 Patienten enthalten.

##### **2.2.1.1.1 Vorbereitung des Materials für die FISH**

###### **2.2.1.1.1.1 Aufbau der Multiblocke und Anfertigung der Paraffinschnitte**

Routinemäßig wird von jedem Tumor ein Paraffinblock angefertigt und anschließend archiviert. Aus solchen Blöcken können Stanzen entnommen werden und in einen neuen Paraffinblock eingebracht werden. Der dabei entstehende Multiblock kann Stanzen von beliebig vielen verschiedenen Tumoren enthalten. In dieser Arbeit war die Verwendung von Multiblocken vorgesehen, die Karzinomgewebe von bis zu 60 Patienten enthalten. Von diesem Ausgangsmaterial wurden Paraffinschnitte angefertigt.

Dazu wurde der Multiblock zuerst bei -10°C auf eine Kühlplatte (Medite/Tissue Cool Plate COP 20) aufgebracht, um das Paraffingewebe leichter schneiden zu können. Mit einem Schlittenmikrotom (MICROTOM HM 400R, Heidelberg) wurden vom Tissueblock 3  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Mit einem Pinsel oder einer Pinzette wurde der Gewebeschnitt vom Skalpell abgetragen und in ein 50°C warmes Wasserbad gegeben. Dadurch konnte sich der Schnitt entfalten und erhielt eine glatte Oberfläche. Zuletzt wurde der Paraffinschnitt mit einer Pinzette auf einen Objektträger aufgezogen und bis zu seiner weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

###### **2.2.1.1.1.2 Bestandteile des UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit**

Der ursprünglich vorgesehene Einsatzbereich für das UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kit (UroVysion Kit) ist die Anwendung als nicht invasive Methode zur Überwachung des

Wiederauftretens von Tumoren bei Patient/innen mit zuvor diagnostizierten Blasenkrebs. Mittels FISH gelingt in Urinproben dieser Patient/innen mit Übergangszell-Karzinomen der Blase der Nachweis von Aneuploidie der Chromosomen 3, 7, 17 und des Verlustes des Lokus 9p21 (Vysis, Abbott, Wiesbaden).

Am Institut für Pathologie der Universität Regensburg wird das UroVysion Kit nicht nur an Urinproben und Harnblasenurothel eingesetzt, sondern auch an verschiedenen anderen Geweben. In dieser Arbeit erfolgte erstmalig die Anwendung an Kolongewebe.

Das Kit setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (Vysis, Abbott, Wiesbaden): Es wurde ein Kit verwendet, das Reagenzien in ausreichender Menge für etwa 20 Tests enthält. Ein Test ist durch ein rundes Zielareal mit einem Durchmesser von 6 mm definiert. In einem Kit sind eine UroVysion Sonden-Mischung, ein DAPI II Gegenfärbemittel, NP-40 und 20xSSC Salz enthalten.

60 µl Sonden-Mischung sollte für 20 Tests reichen; pro Test verwendet man ca. 3 µl. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20°C im Dunkeln. Die UroVysion Sonden-Mischung besteht aus den centromerspezifischen Chromosomensonden CEP 3 SpectrumRed™ (Chromosome Enumeration Probe, CEP®), CEP 7 SpectrumGreen™ (Chromosome Enumeration Probe, CEP®), CEP 17 SpectrumAqua™ (Chromosome Enumeration Probe, CEP®) und der Lokus-spezifischen Sonde 9p21 SpectrumGold™ (Lokus Specific Identifier, LSI®).

Diese Fluorophor-markierten DNA-Sonden befinden sich in einem Hybridisierungspuffer, der aus Dextransulfat, Formamid und SSC besteht.

Bei den centromerspezifischen Chromosomensonden CEP 3, CEP 7 und CEP 17 handelt es sich um drei Alpha-Satellit-Repeat-Sequenzen, während LSI p16 eine einzelne Sequenz-Probe ist, die mit dem p16-Gen der 9p21 Region auf dem Chromosom 9 hybridisiert (UroVysion).

Das DAPI II Gegenfärbemittel muss ebenfalls bei -20°C im Dunkeln gelagert werden und dient der Anfärbung der Zellkerne. 300 µl reichen für 20 Tests. Das Gegenfärbemittel enthält 125 ng/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) in 1,4-Phenylendiamin, Glyzerin und Puffer. Das Kit enthält außerdem 2 x 2 ml NP-40, das variabel bei -20°C bis -25°C gelagert werden kann.

Das 20xSSC Salz (standard citrate saline) besteht aus 66 g Natriumchlorid und Natriumcitrat, was für bis zu 250 ml 20xSSC-Lösung verwendet werden kann und ebenfalls zwischen -25°C und -30°C aufbewahrt werden kann.



Fluorophore bleichen unter Lichteinfluss schnell aus, daher sollte sowohl das geöffnete als auch das ungeöffnete Kit vor Licht, Hitze und Feuchtigkeit geschützt werden und im Kühlschrank bei -20°C gelagert werden.

### **2.2.1.1.1.3 Verwendete Lösungen**

#### Zusammensetzung der PBS (phosphate buffered saline)-Lösung (Grundrezept für 1 l):

- |  |            |
|--|------------|
| • NaCl z.A., ISO (Merck KgaA, Darmstadt):                                | 8,0 g      |
| • Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> z.A. (Merck KgaA, Darmstadt):         | 1,44 g     |
| • KCL (Merck KgaA, Darmstadt):   | 0,20 g     |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> z.A. (J. T. Baker, Deventer, Holland): | 0,24 g     |
| • H <sub>2</sub> Omillipore (Millipore, Eschborn):                       | ad 1 Liter |

Die Herstellung der PBS-Lösung erfolgte im „post-Labor“.

#### Zusammensetzung der 20xSSC (standard saline citrate)-Lösung (Grundrezept für 1 l):

- |   |            |
|---|------------|
| • NaCl z.A., ACS, ISO (Merck KgaA, Darmstadt):              | 175,32 g   |
| • NaCitrat-2-hydrat (J. T. Baker, B. v. Deventer, Holland): | 88,24 g    |
| • H <sub>2</sub> Omillipore (Millipore, Eschborn):          | ad 1 Liter |

Nach Lösung der Salze wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf pH=5,3 eingestellt.

Zum Teil wurde auch das im UroVysion Kit enthaltene 20xSSC Salz verwendet (Menge pro Kit: 66 g für bis zu 250 ml 20xSSC-Lösung; Aufbewahrung: -25°C bis -30°C; Zusammensetzung: Natriumchlorid und Natriumcitrat).

#### Zusammensetzung der 2xSSC (standard saline citrate)-Lösung:

- |  |          |
|--|----------|
| • 20xSSC (Zusammensetzung s.o.):                   | 5 ml     |
| • H <sub>2</sub> Omillipore (Millipore, Eschborn): | ad 50 ml |

Die Herstellung erfolgte jedes Mal frisch im Messzylinder. Nach Zugabe eines Rührfisches wurde der pH-Wert durch Zugabe von ca. 50µl 1 N NaOH auf pH=7,0-7,1 eingestellt.

Zusammensetzung der 2xSSC/0,3%NP40-Lösung:

- 20xSSC (Zusammensetzung s.o.): 100 ml
- H<sub>2</sub>Omillipore (Millipore, Eschborn): 897 ml
- NP40 (im UroVysion Kit enthalten): 3 ml

Vor jeder Färbung musste der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit 1 N NaOH auf pH=7,0-7,5 korrigiert werden.

Zusammensetzung der 0,4xSSC/0,3%NP40-Lösung:

- 20xSSC (Zusammensetzung s.o.): 10 ml
- H<sub>2</sub>Omillipore (Millipore, Eschborn): 488,5 ml
- NP40 (im UroVysion Kit enthalten): 1,5 ml

Vor jeder Färbung musste der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit 1 N NaOH auf pH=7,0-7,5 korrigiert werden.

Ethanol-Waschlösungen (J. T. Baker, Deventer, Holland):

- Ethanol 70%
- Ethanol 80%
- ETOH 100%

Außerdem wurden 2 Küvetten Xylol (frisch) zum Waschen benötigt.

**2.2.1.1.2 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 1****2.2.1.1.2.1 Vorbereitung**

Die Anfertigung der Paraffinschnitte und die Herstellung der benötigten Lösungen wurden bereits erläutert. Wenn sowohl die Objektträger und die entsprechenden Reagenzien bereit gestellt waren, galt es zuerst, eine Küvette, die mit frisch hergestelltem 2xSSC gefüllt war, in ein Wasserbad zu stellen. Die Temperatur musste beim später erfolgenden Schritt 73°C betragen. Die Temperaturanzeige wurde auf ca. 74°C eingestellt und ein geeichtes Thermometer bereitgelegt. Das Aufheizen dauert etwa 30 Minuten.

Außerdem wurde eine befeuchtete Hybridisierungskammer in den 37° Umluft-Brutschrank gestellt. Dabei handelt es sich um einen luftdichten Behälter, dessen Wände mit befeuchteten Papiertüchern ausgelegt sind und der mehrere Unterteilungswände besitzt, worauf man später die Objektträger ablegen kann.

### **2.2.1.1.2.2 Durchführung**

Die angefertigten Schnitte wurden zuerst 35 Minuten bei 72°C entparaffiniert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Es folgte eine Behandlung in frischem Xylol für dreimal zehn Minuten.

Für den Wasserentzug wurden die Schnitte kurz in 100%-iges Ethanol getaucht und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Mit dem Temperaturfühler wurde überprüft, ob sich die 2xSSC-Lösung auf 73+/-1°C erwärmt hatte. Falls ja, wurden die Objektträger darin zwei Minuten lang inkubiert. Dadurch erfolgte die Denaturierung der DNA-Proben.

Nachdem die Präparate mit einer Pinzette aus der Denaturierungslösung entfernt worden waren, wusch man sie vier Minuten lang in PBS-Lösung, um Reste der 2xSSC-Lösung zu entfernen.

Erneut wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurde ein Tropfen Proteinase K (Dako; Merck KgaA, Darmstadt) auf die Schnitte gegeben und es erfolgte eine Inkubation für 45 bis 60 Minuten in der feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank.

Während sich die DNA-Proben im Brutschrank befanden, wurde die UroVysion-Sonde vorbereitet. Dabei musste unbedingt im Dunkeln gearbeitet werden. Sie wurde aus dem -20°C Kühlschrank genommen und die benötigte Menge in einen Eppendorf Cup abgefüllt, kurz bei RT angewärmt und auf einem Vortex-Mixer durchmischt. Dann wurde das Cup mit der Sonde in einen Kunststoffschwimmer gebracht und mindestens fünf Minuten im 73°C Wasserbad denaturiert.

Die letzten beiden Schritte wurden zeitlich aufeinander abgestimmt.

Als nächstes wurde die Heizplatte eingestellt und auf 96°C vorgeheizt.

Wenn die Schnitte ausreichend lange inkubiert worden waren, wurden sie aus der feuchten Kammer genommen und fünf Minuten lang in PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurden die Objektträger in eine aufsteigende Ethanolreihe (je eine Minute in 70%ige, 85%ige und 100%ige EthanolLösung) gebracht.

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Dabei wurde überschüssiges Ethanol vom Objektträger durch Aufsetzen der Objektträgerunterkante auf Löschpapier entfernt und die Objektträgerunterseite mit einem Papiertuch trockengewischt.

Die nun folgende Hybridisierung, war für das Gelingen der FISH ausschlaggebend.

Es wurden 3-10 µl (je nachdem wie viele Stenzen auf dem Paraffinschnitt waren) der Sonde auf ein kleines Deckglas gegeben, welches sofort auf den Schnitt gelegt wurde. Durch vor-

sichtigen Druck auf das Deckglas konnten evtl. vorhandene Luftblasen, die die Hybridisierung verhindern, entfernt und die Sonde gleichmäßig verteilt werden.

Das Deckglas wurde dann mit Fixogum abgedichtet und das so gewonnene Präparat für neun Minuten auf der Heizplatte bei 96°C inkubiert.

Abschließend wurden die Präparate in die vorgewärmte Hybridisierungskammer gesetzt, die feuchte Kammer mit einem festen Deckel verschlossen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.1.1.3 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 2**

#### **2.2.1.1.3.1 Vorbereitung**

Für den zweiten Tag wurden die 2xSSC/0,1%NP40-Lösung und die 0,4xSSC/0,3%NP40-Lösung benötigt. Bei beiden musste überprüft werden, ob der pH-Wert im vorgesehenen Bereich zwischen 7,0 und 7,5 lag und falls nötig mit 1N NaOH korrigiert werden.

Zuerst musste ein Wasserbad auf 73+/-1°C vorgeheizt werden. 30 Minuten vor Beginn der Waschvorgänge nach erfolgter Hybridisierung wurde eine Küvette mit 0,4xSSC/NP40 in das Wasserbad gegeben und ein geeichtes Thermometer wurde bereit gelegt.

Zwei Küvetten wurden mit 2xSSC/0,1%NP40 gefüllt, eine weitere mit deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O Millipore) und bei Raumtemperatur bereit gestellt.

Da die Sonde bereits auf den Präparaten war, wurde am zweiten Tag nur im abgedunkelten Raum gearbeitet.

#### **2.2.1.1.3.2 Durchführung**

Bevor die feuchte Kammer mit den Objektträgern aus dem 37°C Brutschrank geholt wurde, musste die Temperatur der 0,4xSSC/0,3%NP40 überprüft werden. Befand sie sich bei 73+/-1°C wurde die Hybridisierungskammer aus dem Brutschrank genommen und das Fixogum mitsamt Deckglas so schnell wie möglich von den Präparaten entfernt. Sofort nach Entfernen des Deckglases wurden die Schnitte in die 0,4xSSC/0,3%NP40-Lösung eingebracht und zwei Minuten bei 73°C inkubiert. Da immer mit mehreren Präparaten gearbeitet wurde, war es sehr wichtig, dass das Einbringen nicht länger als eine Sekunde pro Objektträger in Anspruch nahm. Es musste stets sicher gestellt werden, dass kein Präparat länger als zwei Minuten in der Waschpufferlösung blieb.

Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je zwei Minuten in 2xSSC/0,1%NP40 gewaschen. Die entsprechenden Küvetten waren in einem Schrank aufgestellt worden, um die Präparate vor Licht zu schützen.

Es folgte eine Spülung in Wasser ( $H_2O$ millipore) bis der Film auf den Objektträgern vollständig entfernt war. Danach wurden die Präparate vollständig getrocknet.

Abschließend wurde ein Tropfen (ca. 12-14 $\mu$ l) DAPI auf das Hybridisierungsareal aufgetragen und ein Deckglas luftblasenfrei aufgebracht. Letzteres wurde mit Nagellack oder Entellan (Merck KGaA, Darmstadt) abgedichtet und die fertigen Präparate wurden bis zum Auszählen der Signale im Dunklen bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.1.2 FISH am Frischgewebe**

Die Auswertung mit den ursprünglich vorgesehenen Paraffin-Multiblocks gestaltete sich schwierig, was vor allem dadurch bedingt war, dass die Zellen im Verband lagen. Die Kerngrenzen konnten nur ungenau bestimmt werden und es kam nur sehr wenig Material von jedem Tumor auf den Objektträger. Daher entschieden wir uns, die FISH am Frischgewebe durchzuführen.

#### **2.2.1.2.1 Vorbereitung des Materials für die FISH**

##### **2.2.1.2.1.1 Herstellung der Touch-Präparate**

Analog zu verschiedenen Studien (Kovach et al., 1991; Dietmaier et al., 1999; Demetrick, 1996) wurde wie folgt verfahren:

Um sicher zu gehen, dass man hauptsächlich Karzinomzellen auf die Objektträger aufbringt, wurde vor dem Anfertigen der Touch-Präparate von dem entsprechenden Gefrierblock ein HE-Schnitt gemacht: Bei -20°C wurden am Kryostat (2800 Frigocut E/Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch) 3  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und anschließend HE gefärbt. Der Gewebeblock wurde dazu auf einen Stempel aufgelegt und sofort mit Eisspray besprüht, damit das Material nicht antaut. Am Raster des Kryostaten wurde die gewünschte Dicke von 3  $\mu$ m eingestellt und mit einem ebenfalls auf -20°C gekühlten Messer wurden die Schnitte gemacht. Durch Betrachten der Präparate unter dem Lichtmikroskop konnte eindeutig ausgemacht werden, ob sich in dem entsprechenden Bereich Tumorzellen befinden und dementsprechend konnten Touch-Präparate angefertigt werden.

Am Kryostat wurden von dem gefrorenen Tumorgewebestück mit einem sterilen Einmalskalpell kleine Einzelteile abgekratzt. Das gewonnene Material stammte aus dem zentralen Teil der Gewebeprobe. Der Randbereich des Gefriermaterials ist häufig ausgetrocknet, wodurch die Zellen morphologisch schlechter erhalten sind und schwerer auf dem Untergrund haften bleiben (Demetrick, 1996). Die Einzelstücke wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf einen trockenen und sauberen Superfrost- oder Starfrost-Objektträger aufgedrückt. Durch mehrma-

liges Betupfen des Objektträgers tauten die Tumorzellen auf und blieben gleichzeitig haften. Während man die Zellen aufbrachte, musste man darauf achten, das Material nicht zu verwischen, um keine Zellkerne zu zerstören bzw. vorwiegend übereinander liegend aufzubringen.

Mehrere fast ausschließlich aus Tumorzellen bestehende Cluster von 50-100 Zellen blieben so auf der Oberfläche des Objektträgers haften (Kovach et al., 1991; Dietmaier et al., 1999).

Die Präparate wurden im Anschluss zehn Minuten luftgetrocknet und schließlich in Carnoy-Lösung (Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1) fixiert.

Nach erfolgter Fixierung wurden die Touch-Präparate erneut zehn Minuten luftgetrocknet.

Um später bei der Färbung und auch bei der mikroskopischen Auswertung der Objektträger die Lokalisation der aufgebrachten Zellen leichter zu erkennen, wurde mit einer Pinzette ein Kreis um die Stelle herum eingeritzt bzw. speziell vorgefertigte Objektträger verwendet.

Wenn die Präparate soweit angefertigt waren, konnten sie entweder bei -20°C für einige Zeit gelagert oder sofort gefärbt werden.

Von jedem Tumor wurden drei Präparate angefertigt. Eines wurde mit HE gefärbt, um die Morphologie der Zellen adäquat beurteilen zu können und zwei weitere wurden für die FISH angefertigt (eines als Ersatzpräparat). Die Herstellung von Touch-Präparaten aus Normalgewebe erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

#### **2.2.1.2.1.2 Bestandteile des UroVysion Bladder Cancer Recurrence Kits**

(vgl. 2.2.1.1.1.2)

#### **2.2.1.2.1.3 Verwendete Lösungen**

##### Zusammensetzung der Carnoy-Lösung:

- Methanol z.A., ACS, ISO (Merck KgaA, Darmstadt)
- Essigsäure 100% z.A., ACS, ISO (Merck KgaA, Darmstadt)

Methanol und Eisessig wurden im Verhältnis 3:1 angesetzt.

##### Zusammensetzung der 20xSSC (standard saline citrate)-Lösung (Grundrezept für 1 l):

- NaCl z.A., ACS, ISO (Merck KgaA, Darmstadt): 175,32 g
- NaCitrat-2-hydrat (J. T. Baker, B. v. Deventer, Holland): 88,24 g
- H<sub>2</sub>Omillipore (Millipore, Eschborn): ad 1 Liter

Nach Lösung der Salze wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf pH=5,3 eingestellt.

Zum Teil wurde auch das im UroVysion Kit enthaltene 20xSSC Salz verwendet (Menge pro Kit: 66 g für bis zu 250 ml 20xSSC-Lösung; Aufbewahrung: -25°C bis 30°C; Zusammensetzung: Natriumchlorid und Natriumcitrat).

Zusammensetzung der 2xSSC (standard saline citrate)-Lösung:

- 20xSSC (Zusammensetzung s.o.): 5 ml
- H<sub>2</sub>Omillipore (Millipore, Eschborn): ad 50 ml

Die Herstellung erfolgte jedes Mal frisch im Messzylinder. Nach Zugabe eines Rührfisches wurde der pH-Wert durch Zugabe von ca. 50 µl 1 N NaOH auf pH=7,0-7,1 eingestellt.

Außerdem wurden folgende Lösungen verwendet:

- Aceton (Merck KgaA, Darmstadt): jede Woche frisch bei -20°C
- Methanol (Meck KgaA, Darmstadt): jede Woche frisch bei Raumtemperatur
- Formalin, ca. 5%: im Eingangslabor; dunkel lagern

### **2.2.1.2.2 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 1**

#### **2.2.1.2.2.1 Vorbereitung des Präparates**

(vgl. 2.2.1.2.1.1)

Im Durchschnitt wurden fünf bis acht Touch-Präparate gleichzeitig angefertigt und gefärbt. Anfangs empfiehlt es sich, mit zwei Präparaten zu arbeiten, um die optimale Durchführung der FISH erlernen zu können.

#### **2.2.1.2.2.2 Vorbereitung zum Färben**

Eine Küvette musste mit Aceton gefüllt werden und bei -20°C mit Folie bedeckt in den Gefrierschrank gestellt werden.

Eine Küvette wurde mit Methanol gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert, eine weitere mit Formalin (5%) in einem Schrank im Dunklen aufbewahrt.

Die benötigte 2xSSC-Lösung wurde frisch im Messzylinder hergestellt. Dazu wurden mit einer 10 ml Pipette 5 ml 20xSSC-Lösung in einen Messzylinder gefüllt und dieser mit deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>Omillipore) ad 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde ein Rührfisch

hinzugegeben und der pH-Wert zwischen 7,0 und 7,1 eingestellt. Dazu wurden ca. 50 µl 1 N NaOH benötigt.

Eine befeuchtete Hybridisierungskammer (genauer Aufbau siehe 2.2.1.1.2.1) wurde in den 37°C Brutschrank gebracht. Das Wasserbad wurde auf 73°C vorgeheizt. Die benötigte Menge der UroVysion-Sonden-Mischung wurde in ein mit Aluminiumfolie umwickeltes Eppendorf-Cup gefüllt und in dem 73°C warmen Wasserbad mindestens fünf Minuten lang denaturiert. Das Arbeiten im Dunkeln durfte bei Schritten, an denen die Sonde beteiligt war, nicht vergessen werden.

Zuletzt wurde die Heizplatte auf 96°C eingestellt und eine Küvette mit deionisiertem Wasser gefüllt.

#### **2.2.1.2.2.3 Fixierung der Zellen**

Zur Fixierung der Zellen wurden die Touch-Präparate zuerst 20 Minuten lang in -20°C kaltes Aceton gegeben. Es folgte eine 20-minütige Behandlung in Methanol bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Objektträger fünf Minuten in das im Dunklen gelagerte Formalin eingebracht und dann kurz in Wasser gespült, um verbleibende Lösungen zu entfernen. Dann wurden die Objektträger zum Trocknen aufgestellt.

Spätestens wenn sich die Touch-Präparate in der Formalinlösung befanden, musste die Sonde in das 73°C Wasserbad gegeben werden, um ausreichend lange denaturieren zu können.

#### **2.2.1.2.2.4 Lyse und Sonde**

Eine kurze Behandlung in dem frisch hergestelltem 2xSSC bei Raumtemperatur war ausreichend, um die Lyse zu gewährleisten.

Bevor die Sonde auf die Präparate gegeben werden konnte, mussten die Objektträger vollständig trocknen.

Die nun folgenden Schritte mussten im Dunkeln erfolgen:

Wenn nötig wurde durch kurzes Zentrifugieren der Inhalt des Eppendorfcups auf den Boden gebracht und dann mit einer Pipette 3 µl der Sonde entnommen. Diese wurden auf ein kleines Deckglas gegeben, welches dann luftblasenfrei auf das Touch-Präparat aufgebracht und mit Fixogum abgedichtet wurde.

Die Objektträger wurden dann zwei bis drei Minuten bei 96°C auf der Heizplatte inkubiert. Falls mehrere Präparate gleichzeitig angefertigt wurden, musste darauf geachtet werden, dass keines von ihnen zu lange auf der Heizplatte blieb.

Über Nacht erfolgte die Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C.



### **2.2.1.2.3 Experimentelle Durchführung der FISH: Tag 2**

#### **2.2.1.2.3.1 Vorbereitung**

Die 2xSSC-Lösung musste frisch im Messzylinder hergestellt werden und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH=7,0-7,1 eingestellt werden (Vorgehen siehe Tag 1). Daneben wurden noch eine Küvette mit deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O Millipore) und das DAPI-Gegenfärbemittel benötigt.

Am zweiten Tag musste stets im Dunklen gearbeitet werden, weil die Sonde bereits auf die Objektträger aufgebracht worden war.

#### **2.2.1.2.3.2 Durchführung**

Nachdem die Präparate aus der Hybridisierungskammer genommen worden waren, musste mit einer Pinzette das Deckglas mit dem Fixogum von den Objektträgern entfernt werden.

Anschließend wurden die Touch-Präparate fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC gewaschen und dann kurz in Wasser gespült bis der Film auf den Objektträgern vollständig entfernt war.

Abschließend erfolgte das Trocknen im Schrank, wozu die Präparate vertikal auf einem Papiertuch aufgestellt wurden.

Erst wenn die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurde auf jeden ein Tropfen (ca. 12-14 µl) DAPI gegeben, ein Deckglas luftblasenfrei aufgebracht und das fertige Präparat mit Nagellack oder Entellan (Merck KGaA, Darmstadt) abgedichtet.

Die Touch-Präparate konnten dann entweder im Dunkeln im Kühlschrank gelagert werden oder, wenn der Nagellack nach ca. 20-30 Minuten getrocknet war, sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

### **2.2.2 Mikroskopische Auswertung der FISH-Präparate**

#### **2.2.2.1 Geräte und Einstellungen**

Die mikroskopische Auswertung sowohl der Paraffinschnitte als auch der Touch-Präparate erfolgte am modularen Fluoreszenzmikroskop *Leitz Aristoplan* (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar). Dieses Auflichtfluoreszenzmikroskop verfügt über eine 50 W starke Quecksilber Höchst-drucklampe als Lichtquelle, welche die Fluorophore zur Fluoreszenz anregt.

Es wurden zwei verschiedene Objektive verwendet. Das Objektiv PL APO (apochromatisches Planobjektiv mit geebnetem Sehfeld bis 28 mm Zwischenbild) mit dem Abbildungsmaßstab (Größenverhältnis von Zwischenbild zu Objekt) 4:1 wurde stets zuerst eingeschwenkt, um die Ebene grob einstellen zu können und die Lokalisation der Tumorzellen auszumachen. Dazu wurde der Filterblock A eingesetzt, um die mit DAPI gegengefärbten, leuchtend blau fluoreszierenden Zellkerne darzustellen. Unter Verwendung des Objektives PL FLUOTAR® (halbapochromatisches Planobjektiv mit geebnetem Sehfeld bis 25 mm Zwischenbild) konnten die Zellkerne und die darin enthaltenen Fluoreszenzsignale mittels Ölimmersion im Abbildungsmaßstab 100:1 dargestellt werden.

Es wurden vier verschiedene Fluoreszenzmikroskop-Filtersätze verwendet: Der Einzelbandpass-Yellow, der Einzelbandpass-Aqua, der DAPI-Einzelbandpass und der Green/Red-Doppelbandpass. Die Hybridisierung der LSI 9p21- und der CEP 3-, 7- und 17-Sonden an ihre spezifischen chromosomalen Regionen, sind an der jeweiligen Fluoreszenz in Gold, Rot, Grün und Aqua zu erkennen. Die verbleibende Zellkern-DNA fluoresziert mit der DAPI-Gegenfärbung blau (Vysis, Abbott, Wiesbaden). Zur Beurteilung der Quantität und Qualität der mit DAPI gegengefärbten Zellkerne wurde der Filterblock A (Nr. 513678) eingesetzt, dessen Anregungsspektrum im UV-Bereich zwischen 340 und 380 nm liegt, und damit das Exzitationsmaximum von DAPI bei ca. 360 nm mit einschließt. Der Emissionsbereich liegt bei 460 nm $\pm$  25 nm. Zum Auszählen der Signale wurden die Filter *Greenred*, *Aristo* (Nr. 30-150641/C-00431), *Yellow*, *LEICA ARIST* (Nr. 30-150741/C-00429) und *Aqua*, *LEICA ARIST* (Nr. 30-150041/C-00430) verwendet. Das Exzitationsspektrum von Green liegt bei 480 nm $\pm$  15nm, das Emissionsspektrum bei 535 nm $\pm$ 20 nm. Der Exzitationsbereich von Red liegt bei 560 nm $\pm$ 20 nm, der Emissionsbereich bei 630 nm $\pm$ 30 nm. Für Yellow und Aqua gelten folgende Werte: Yellow (Exzitation: 538 nm $\pm$ 10 nm; Emission: 560 nm-590 nm), Aqua (Exzitation: 436 nm $\pm$ 5 nm; Emission: 470 nm-490 nm).

### **2.2.2.2 Auswertungskriterien**

Bei der Entscheidung, ob und wie ein Präparat beurteilt werden sollte, orientierte man sich an den Bewertungskriterien von Vysis (Abbott, Wiesbaden) und von Lengauer et al. (1997).

Während der Durchführung und Auswertung der FISH waren neben der Eingangsnummer keine weiteren Patientendaten bekannt. Weder klinische, noch pathologische oder molekularbiologische Informationen standen zur Verfügung.

#### **2.2.2.2.1 Qualität des Präparates**

Unter Verwendung des Ölimmersionsobjektivs (100-fache Vergrößerung) galt es zuerst, die Fokusebene einzustellen. Mit dem DAPI-Einzelbandpass-Filter verschaffte man sich einen Überblick, ob ausreichend viele Tumorzellen auf dem Präparat waren, um dieses auswerten zu können. Dann wurden nacheinander die Filter Greenred, Aqua und Yellow eingesetzt, um einen Eindruck über die Größe und Form der Fluoreszenzsignale zu gewinnen. Die Signale für alle vier Sonden mussten sichtbar und ausreichend gut beurteilbar sein. Zugleich konnte man prüfen, ob unspezifische Fluoreszenzsignale im Sinne einer Verschmutzung des Präparates vorhanden waren und falls ja, eventuell die Auswertung behinderten. Zuletzt musste sicher gestellt werden, ob die Fluoreszenzsignale eindeutig einem bestimmten Zellkern zugeordnet werden konnten.

Falls das FISH-Präparat unter Berücksichtigung der genannten Punkte in die Analyse eingeschlossen werden konnte, begann man mit der genauen Interpretation. Anderenfalls wurde an dieser Stelle entschieden, eine erneute FISH mit den Ersatzpräparaten durchzuführen.

Für jedes Präparat wurde neben der Dokumentation der Signalzahl der einzelnen Sonden ein FISH-Auswertungsbogen ausgefüllt. Darauf wurde zuerst die Beurteilbarkeit des entsprechenden Objektträgers angegeben (gut/eingeschränkt/schlecht). Schlecht beurteilbare Objektträger wurden nicht ausgewertet. Außerdem wurde die analysierbare Fläche in Prozent angegeben und es bestand die Möglichkeit, kurze Bemerkungen zu machen. So konnten besondere Merkmale einzelner Tumoren dokumentiert werden und bei der späteren Fotodokumentation berücksichtigt werden. Zuletzt wurde die Zellzahl vermerkt, die stets zwischen 100 und 200 Zellen lag. Die genaue Zellzahl war abhängig von der Qualität und Quantität der Tumorzellen.

#### **2.2.2.2.2 Qualität und Quantität der Tumorzellen**

- Potentiell maligne Zellen mussten selektiert werden. Wichtigstes Kriterium hierfür war die Zellkernmorphologie in der DAPI-Gegenfärbung. Tumorzellen weisen vor al-

lem große Kerne mit unregelmäßiger Form auf und liegen bevorzugt in Clustern zusammen.

- Sich überlappende Kerne in Zellhaufen wurden nicht gezählt, da dies die Gefahr birgt, dass Signale falsch zugeordnet werden.
- Kerne, die keine Eigenform mehr erkennen ließen wurde nicht gezählt, selbst wenn sie scheinbar eindeutige Signale enthielten.
- Kleine, runde, lymphozytenähnliche Zellkerne wurden bei der Analyse der Tumorpräparate nicht mit bewertet. Diese morphologisch normalen Kerne, die sich in fast jedem der Präparate fanden, waren Bindegewebszellen, benignen Kolonschleimhautzellen oder Lymphozyten zuzuordnen.
- Bei der Interpretation der Normalgewebe, die aus gesunder Kolonschleimhaut gewonnen worden waren, fanden sich ausschließlich diese phänotypisch unauffälligen Kerne und wurden auch gezählt.
- Von jedem Zellkern wurde die Signalzahl für alle vier Sonden bestimmt und dokumentiert.
- Kerne, die gar keine Signale aufwiesen oder bei einem der Marker für die Chromosomen 3, 7 und 17 einen Verlust beider Chromosomen zeigten, wurden nicht mit einbezogen, da man in diesem Fall von einer fehlerhaften Hybridisierung ausgehen musste.
- War ein Verlust beider Kopien von LSI 9p21 sichtbar, fehlten also beide gelben Signale, wurden die Kerne in die Auswertung mit einbezogen, da es sich dabei um ein Tumorsuppressorgen handelt, das einen homozygoten Verlust aufweisen kann.
- Signale die außerhalb des mit DAPI gefärbten Kerns lagen und damit nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden nicht berücksichtigt.
- Auf das Vorhandensein von diffusen Signalen und Doppelsignalen musste besonders geachtet werden. Ein diffuses Signal wurde nur dann gezählt, wenn es zusammenhängend und ausreichend eingegrenzt war. Zwei Signale, die eine sichtbare Verbindung aufwiesen, wurden als Doppelsignal bezeichnet und als ein Signal gezählt. Ein doppeltes oder ein diffuses Signal kann als Folge der variablen DNA-Dichte innerhalb des Zellkerns auftreten, dessen Dichte von der jeweils aktuellen Stufe der Zellteilung abhängt; es zeigt keine zusätzliche Kopie des Chromosoms in diesen Zellen an (Vysis, Abbott, Wiesbaden).
- Pro Objektträger wurden auf diese Weise 100 bis 200 Zellkerne beurteilt. Da nur Kerne gezählt wurden, die eindeutig interpretierbar waren, war die Zahl manchmal begrenzt. In wenigen Fällen zeigte sich ein eindeutiges Chromosomenmuster, das sich

fast in jeder Tumorzelle wiederholte, so dass auf die Auswertung von 200 Zellen verzichtet werden konnte.

- Bei den Hybridisierungsprodukten aus Normalgewebe wurden in jedem Fall 200 Zellen ausgewertet, da diese nicht nur dem Vergleich mit Tumorgewebe dienten, sondern auch der Effizienz- und Qualitätskontrolle.

### **2.2.2.3 Auszählen der Objektträger**

#### **2.2.2.3.1 Vorgehen**

Nach erfolgter Färbung wurden alle Präparate innerhalb der nächsten 48 Stunden am Fluoreszenzmikroskop LEITZ ARISTOPLAN mikroskopiert und ausgewertet. Zuerst wurde das Mikroskop eingeschaltet und ca. 15 Minuten laufen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die benötigten Filterblöcke ausgewählt und jeweils zwei in die Schwalbenschwanzaufnahme eines Fluoreszenzmoduls geschoben. Ein Fluoreszenzmodul enthielt den Einzelbandpass DAPI und den Doppelbandpass Greenred, ein weiteres die beiden Einzelbandpässe Aqua und Yellow.

Nachdem die Vorbereitungen am Mikroskop getroffen waren, wurde der Raum vollständig abgedunkelt, die Präparate aus dem Kühlschrank geholt und etwas angewärmt.

Der Objektträger wurde in den drehbaren Kreutztisch eingespannt und mit dem Objektiv PL APO 4x/0,14 wurde die Lokalisation der Tumorzellen und die grobe Ebene aufgesucht. Anschließend wurde ein Tropfen Öl auf den Objektträger gegeben und das Ölimmersionsobjektiv PL FLUOTAR® 100x/1,32 eingeschwenkt. Die Fokusebene wurde eingestellt und man verschaffte sich einen groben Überblick über das Präparat, um entscheiden zu können, ob der Objektträger auswertbar ist (siehe 2.2.2.2.1 und 2.2.2.2.2).

Ausgehend von der linken oberen Ecke des Präparates wurde dieses mäanderförmig durchgemustert. Zuerst wurde mit dem DAPI-Filter die Lage und die Begrenzung eines oder auch mehrerer Kerne ausgemacht, sich eingeprägt und anschließend mit dem Greenred-Filter die Anzahl der grünen und roten Signale, also der Chromosomen 7 und 3, bestimmt. Dabei wurde der DAPI-Filter mehrmals kurz in den Strahlengang gebracht, um sich wiederholt die Zellkerngrenzen klar zu machen. Anschließend wurde das zweite Fluoreszenzmodul in die dafür vorgesehene Stativöffnung gebracht und nacheinander die Filterblöcke Aqua und Yellow eingebracht. Auf diese Weise wurde die Anzahl der blauen und gelben Signale bestimmt, also die Kopienzahl des Chromosoms 17 und der Gen-Region p16(9p21) auf Chromosom 9.

### **2.2.2.3.2 Dokumentation**

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden vorgefertigte UroVysion-Auswertungsbögen verwendet. Zusätzlich wurden die Werte in eine Excel-Tabelle übertragen.

## **2.2.3 Fotodokumentation der FISH-Präparate**

### **2.2.3.1 Geräte und Einstellungen**

Die Fotodokumentation von exemplarischen FISH-Präparaten erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 (Zeiss, Oberkochen) mit Hilfe eines Kamerasystems (Princeton, Philadelphia) und der Software MetaMorph (Universal Imaging Corp.). Das Axiovert S100-Mikroskop ist mit einer 50 W starken Quecksilberlampe (HBO50W / AC L1, Osram, München) als Anregungsquelle ausgestattet und verfügt über verschiedene Filtersysteme.

Ein blaues Fluoreszieren der mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) gegengefärbten Zellkerne wurde mit dem Mikroskop unter Verwendung einer Anregung von 360 $\pm$ 20 nm (Chroma D360/40x) und einer Emission von 460 $\pm$ 25 nm (Chroma D460/50) erreicht. Für die Darstellung der vier verschiedenen Fluoreszenzsignale standen folgende Filtersysteme zur Verfügung:

- „FITC“ für die grüne Fluoreszenz von CEP7: Anregungsfilter (Chroma D480/30x): 480 $\pm$ 15 nm; Emissionsfilter (Chroma D535/40): 535 $\pm$ 20 nm.
- „TexasRed“ für die rote Fluoreszenz von CEP3: Anregungsfilter (Chroma D560/40x): 560 $\pm$ 20 nm; Emissionsfilter (Chroma D630/30): 630 $\pm$ 30 nm.
- „Aqua“ für die blaue Fluoreszenz von CEP17: Anregungsfilter (Chroma HQ436/10x): 436 $\pm$ 5 nm; Emissionsfilter (Chroma 61007m, tripple bandpass für Aqua, Gold und FarRed): ~470 nm-490 nm.
- „Gold“ für die gelbe Fluoreszenz von LSI p16 (9p21): Anregungsfilter (Chroma HQ538/19x): 538 $\pm$ 10 nm; Emissionsfilter (Chroma 61007m, tripple bandpass für Aqua, Gold und FarRed): ~560 nm-590 nm.
- Außerdem stand ein weiterer Emissionsfilter (Chroma 61002) zur Verfügung, der tripple bandpass DAPI (~450 nm-470 nm) / FITC (~520 nm-550 nm) / TexasRed (~600 nm-650 nm).

Des Weiteren verfügt das Mikroskop über die beiden Strahlenteiler (Chroma) DAPI/FITC/TexasRed (Dichroic61002bs) und Aqua/Gold/FarRed (Dichroic61007bs), deren Position außen am Gerät verändert werden kann. Das Fluoreszenzmikroskop verfügt über

verschiedene Objektive. Für die Schichtaufnahmen wurde das Plan-Apochromat-Objektiv 63x/1,40 Ph3 (Öl) mit piezoelektrischem z-Stelltrieb (Auflösung 10 nm) verwendet.

Die Bilder wurden mit einer Kamera (Princeton Instrument MicroMax RTE/CCD-1317-K/1; Rober Scientific) mit hohem Auflösungsvermögen aufgezeichnet (Chip KODAK; 4096 Graustufen, 1317x1035 Pixel, 6,8 µm x 6,8 µm Pixelgröße).

Mit Hilfe der MetaMorph Software zur Steuerung der Mikroskopierfunktionen, sowie für Bildaufnahmen und Bildanalyse auf dem Hauptrechner (Pentium III 1200 MHz, 768 MB RAM, 18 GB HD) wurde jede Farbe einzeln aufgenommen und digital (Filtern, Kontrastverstärkung) verarbeitet. Schließlich wurden die einzelnen Farbbilder übereinander gelegt und ein Gesamtbild gewonnen.

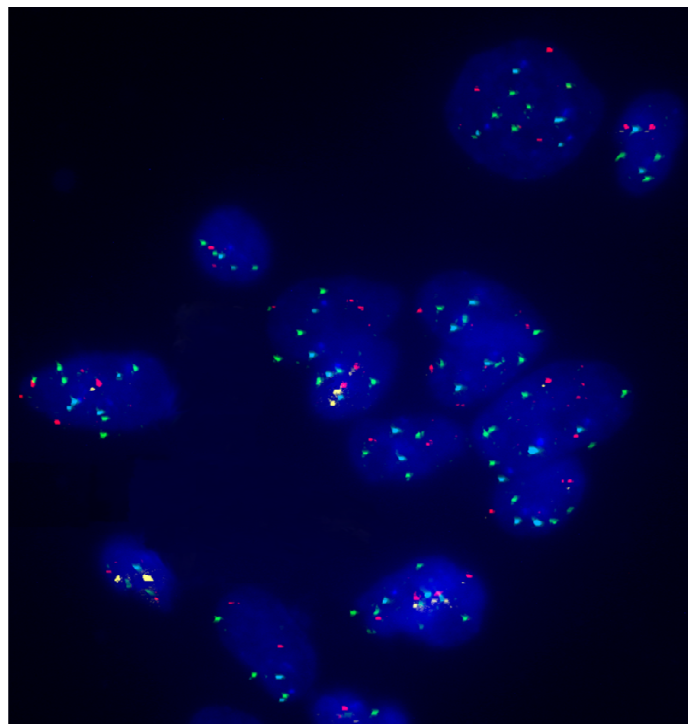
### **2.2.3.2 Praktisches Vorgehen**

Ein Arbeiten im Dunkeln war unbedingt erforderlich.

Sowohl für die Arbeit mit der Kamera als auch mit der Quecksilberlampe war eine Klimaanlage erforderlich, die stets zuerst angestellt wurde. Nacheinander wurden Lampe, Mikroskop und schließlich der Computer gestartet. Über die Software MetaMorph konnten sowohl die Mikroskopierfunktionen, als auch die Bildaufnahmen gesteuert werden. Die verschiedenen Filtersysteme (siehe 2.2.3.1) konnten über „Befehle“ der Software in den Strahlengang gebracht werden. Dazu musste man am Mikroskop den entsprechenden Strahlenteiler in die richtige Position bringen.

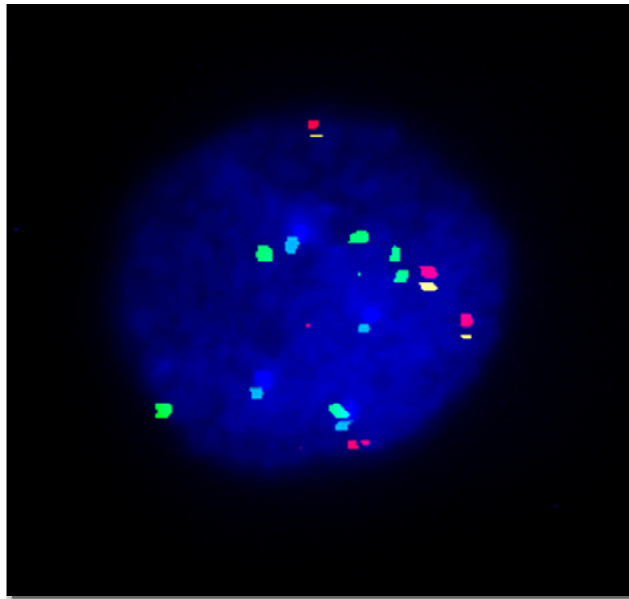
Am Mikroskop wurde das Plan-Apochromat-Objektiv (63 x 1,4) eingestellt und zwei Tropfen Öl darauf gegeben. Der Objektträger wurde mit dem Gesicht nach unten am Mikroskop eingespannt. Der tripple bandpass-Filter DAPI/FITC/TexasRed wurde in den Strahlengang gebracht und unter Sicht die Ebene eingestellt. Nachdem man sich einen Überblick über das Präparat verschafft hatte, galt es die vorgesehene Stelle für das Foto aufzusuchen und in die Mitte des Sichtfeldes zu bringen. Zuerst wurden die mit DAPI gefärbten Zellkerne fotografiert. Dazu wurde der entsprechende Filter in den Strahlengang gebracht und eine Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 18 Sekunden gemacht. Da damit ohnehin nur der Zellkernriss dargestellt werden sollte, konnte man auf Schichtaufnahmen verzichten. Das Bild mit den Zellkernen wurde abgespeichert. Bei den Aufnahmen der vier Einzelfarben war es sehr wichtig, dass man alle Signale, die teilweise in unterschiedlichen Ebenen liegen erfasste. Dies erforderte folgendes Vorgehen: Zuerst musste der jeweilige Filter in den Strahlengang gebracht werden. In der Regel wurde mit TexasRed begonnen. Um alle Signale zu erfassen, hatte man über die MetaMorph-Software drei Ebenen definiert: „Go to Home“ war als 0 µm festgelegt

worden, „Go to Top“ als  $+2\ \mu\text{m}$  und „Go to Bottom“ als  $-2\ \mu\text{m}$ . Zuerst wurde auf „Go to Home“ geklickt und am Mikroskop per Hand die Mehrzahl der Signale scharf eingestellt. Anschließend wurden die verbleibenden Signale in den beiden anderen Ebenen scharf gestellt. Wenn diese Einstellungen getroffen waren und man sicher war alle Signale der jeweiligen Farbe erfasst zu haben, wurden über den Befehl „Acquire Z Series“ 20 Schichtaufnahmen in dem Bereich von  $-2\ \mu\text{m}$  bis  $+2\ \mu\text{m}$  gemacht, wobei die gewählte Belichtungszeit pro Aufnahme zehn Sekunden betrug. Die 20 Einzelbilder wurden dann über den Befehl „3 D-Reconstruction“ übereinandergelegt und man erhielt für die jeweilige Farbe ein Bild, auf dem alle Signale zu sehen waren. Nacheinander wurden Schichtaufnahmen für die Farben TexasRed, FITC, Aqua und Gold gemacht und die entstehenden Einzelbilder, genau wie die DAPI-Aufnahme zwischengespeichert. Über den Befehl „FISH Farben Overlay“ wurden die Bilder nacheinander aufgerufen und über die Software, die Größe und Intensität der nun erstmals farbig erscheinenden Signale und des Hintergrundes eingestellt. Wenn dies für jede Farbe geschehen war, ließ sich über die Befehle „Process“, „Stack Arithmetic“ und „Apply“ ein Gesamtbild konstruieren, das neben der Kernfärbung „DAPI“ alle Farbsignale enthielt. Häufig wurde zusätzlich jede Farbe einzeln auf dem DAPI-Hintergrund dargestellt, was man dadurch erreichte, dass man die Intensität der drei anderen Farbsignale auf null stellte. Über die Befehle „Display“ und „Color Align“ bestand die Möglichkeit, Bilder zu erstellen, die nur rote und grüne Signale zeigten. Auch darauf wurde in Einzelfällen zurückgegriffen.

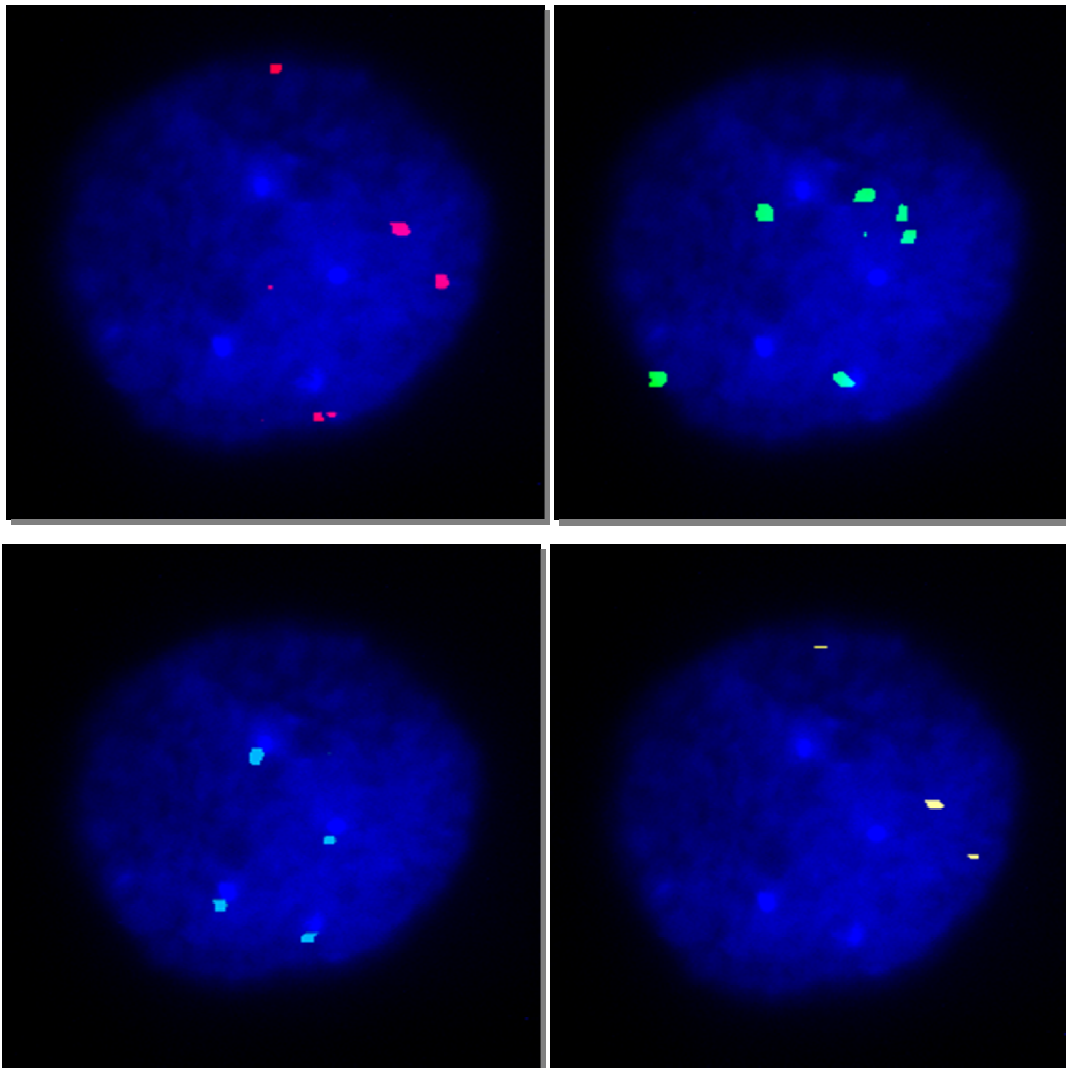


**FISH-Bild 1: Beispiel eines chromosomal instabilen Tumors**

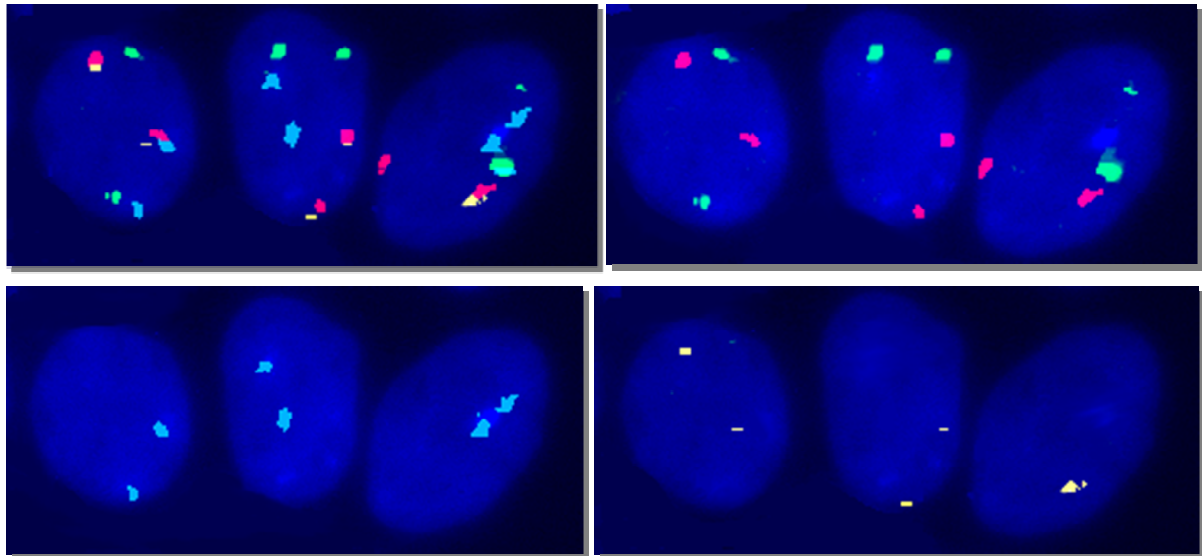




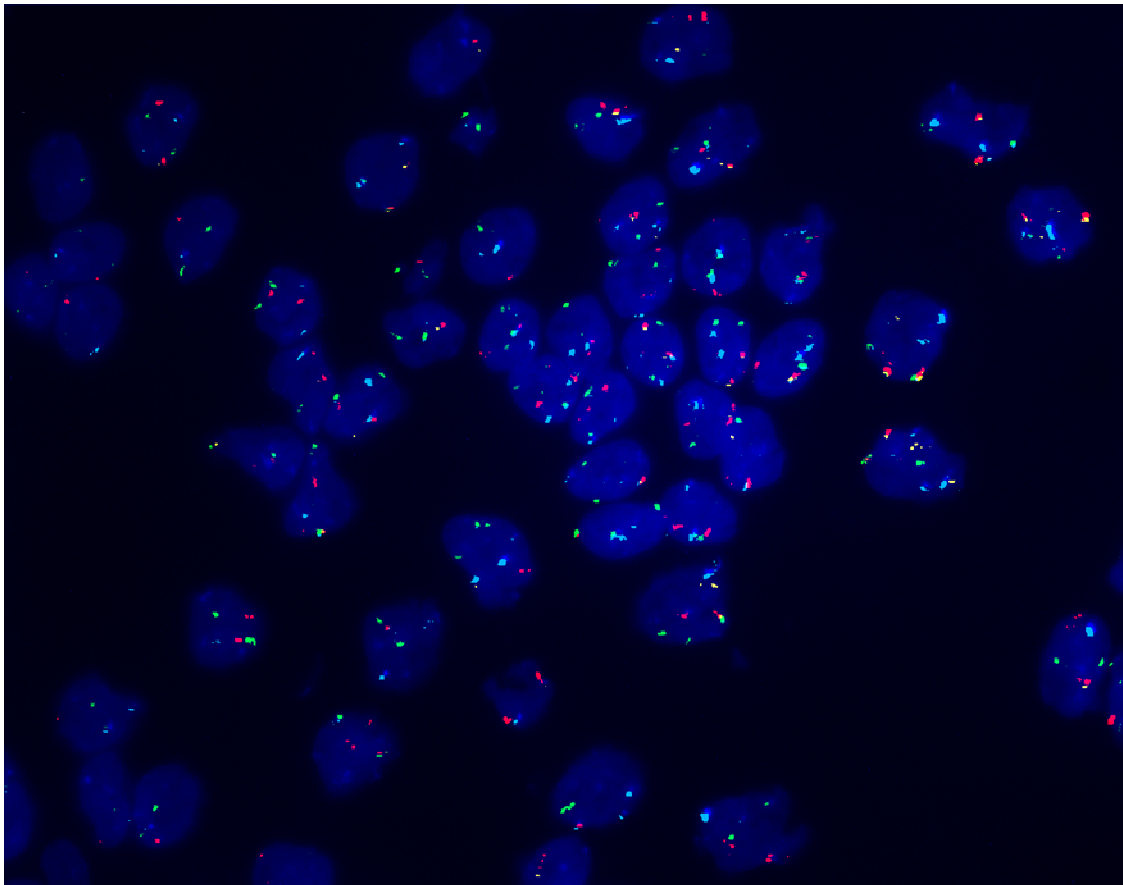
*FISH-Bild 2: Beispiel einer chromosomal instabilen Tumorzelle*



*FISH-Bild 3: Einzelne Centromermarker in einer chromosomal instabilen Tumorzelle*



**FISH-Bild 4: Beispiel von drei Normalgewebszellen**



**FISH-Bild 5: Normalgewebe in der Übersicht**

### **2.2.4 PCR zum MSI-Nachweis**

Als wichtigstes Vergleichsmaterial für die mit FISH gewonnen Ergebnisse bezüglich dem Vorliegen einer Aneuploidie diente der durch PCR-Untersuchung festgelegte Mikrosatellitenstatus. Von einem Großteil der Patienten lagen diese Ergebnisse bereits vor. Einige der Analysen mussten aufgrund widersprüchlicher oder schwer interpretierbarer Ergebnisse wiederholt werden. War bisher noch keine MSI-Analyse erfolgt, wurde sie nachträglich erhoben. Das praktische Vorgehen zur Ermittlung des MS-Status mittels PCR war jedoch nicht Mittelpunkt dieser Arbeit. Vielmehr galt es, die bereits vorliegenden oder neu gewonnenen Daten richtig zu interpretieren. Die Verfahrensweise soll deshalb nur im Überblick erläutert werden.

#### **2.2.4.1 Praktisches Vorgehen**

##### **2.2.4.1.1 Reagenzien**

- H<sub>2</sub>O (Aqua dest)
- Methylenblau (ca. 0,01%)
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)
- 10x Rx Buffer
- dNTPs (Deoxynucleoside Triphosphate Set)
- Taq-Polymerase
- HiDi Formamid
- HD Rox 400 Standard
- Multimix (enthält Primer)

##### **2.2.4.1.2 Untersuchungsmaterial**

Ausgangsmaterial für die Untersuchung sind archivierte Paraffinblöcke, die routinemäßig von jedem Tumor angefertigt werden. Es werden je 3 Paraffinleerschnitte von Normal- und Tumorgewebe benötigt.

##### **2.2.4.1.3 Mikrodissektion**

Um die Abgrenzung von Kolongewebe und Bindegewebe bei der Mikrodissektion zu erleichtern, wurden die Paraffinleerschnitte mit einer 0,01%igen Methylenblaulösung angefärbt. Anschließend wurden die zu mikrodissezierenden Normal- und Karzinomgewebe unter dem Stereomikroskop bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Dabei diente der angefertigte HE-

Schnitt, auf welchem ein Pathologe die entsprechende Region speziell gekennzeichnet hatte, als direkter Vergleich. Mit Hilfe steriler Kanülen erfolgte die Mikrodissektion.

#### **2.2.4.1.4 DNA-Isolierung**

Es folgte die DNA-Isolierung und -Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines 1,3%igen Agarosegels oder einer photometrischen Messung. Die für die PCR eingesetzte DNA-Menge betrug zwischen 100 und 150 ng.

#### **2.2.4.1.5 MSI-PCR 1.Panel**

Die Amplifikation der DNA erfolgte unter Verwendung folgender Primer, die im 1.Panel enthalten sind:

BAT 25-Up-6-FAM	TCG GCT CCA AGA ATG TAA GT
BAT 25-Down	TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC
BAT 26-Up-NED	TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC
BAT 26-Down	AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C
APC-Up	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG
APC-Down-Hex	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T
D17S250-Up-NED (MFD15)	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT
D17S250-Down (MFD15)	GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC
D2S123-Up-FAM	AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA
D2S123-Down	GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC

Folgende Primer können zusätzlich eingesetzt werden:

D18S61-Up	AAC CAA CAT AAT ATA GCA ATG G
D18S61-Down-Hex	TTC GAA CTT CGA ACC ACC C
TP53-ALS-Up-FAM	TCG AGG AGG TTG CAG TAA GCG GA
TP53-ALS-Down	AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG

Die Endkonzentration dieser Primer im Multimix betrug, abhängig von der Amplifikationseffizienz, zwischen 0,2 und 0,5 µM.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des PCR- Ansatzes:

	MM 1 für 1 Reaktionen			
	µl	Endkonzentration	Stammlösung	
H <sub>2</sub> O	14,5			
DMSO	1,5	5%	100%	
MgCL <sub>2</sub>	1,8	1,5mM	25mM	
10x Rx Buffer	3,0	1x	10x	
DNTPs	0,6	0,2mM	10mM	
Multimix	3,0	1x	10x	
Taq-Polymerase	0,6	0,1U/µl	5U/µl	
<b>Total</b>	<b>25,0</b>			
add 25,0 µl MM to 5,0 µl template DNA				

Es wurden je nach DNA-Konzentration (10-200 ng/µl) 1-10 µl template DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen wurde durch entsprechende Zugabe von H<sub>2</sub>O konstant auf 30 µl gehalten.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über das PCR-Programm: TD 60/50 35 Zyklen:

94°C	2 min
94°C	1 min
50°C-60°C	1 min (10 Zyklen; pro Zyklus 1°C weniger)
72°C	1 min
94°C	1 min
50°C	1 min (25 Zyklen)
72°C	1 min
72°C	8 min

#### 2.2.4.1.6 Vorbereiten der Fragmentanalyse für den ABI 3100/310

1µl des so gewonnenen PCR-Produktes wurde zusammen mit 12µl HiDi-Formamid und 0,7µl HD ROX 400 (Standard) 3 Minuten bei 94°C denaturiert und auf den Sequenzer geladen.

**2.2.4.1.7 Datenauswertung am Sequenzer**

Bei der Auswertung am ABI 3100/310 ist die Größe und Farbe des PCR-Produktes zu beachten:

BAT 25	ca. 120 BP	blau
BAT 26	ca. 120 BP	schwarz
APC	ca. 114-126 BP	grün
D17S250	ca. 145 BP	schwarz
D2S123	ca. 210 BP	blau
D18S61	ca. 220-230 BP	grün
TP53-ALS	ca. 140-155 BP	blau

**2.2.4.1.8 MSI-PCR 2.Panel**

Das 2. Panel besteht aus folgenden Primern, deren Endkonzentrationen, abhängig von der Amplifikationseffizienz, zwischen 0,2 und 0,5  $\mu$ M im Multimix liegen:

D13S153-Up	AGC ATT GTT TCA TGT TGG TG
D13S153-Down-Hex	CAG CAG TGA AGG TCT AAG CC
BAT 40-Down	GTA GAG CAA GAC CAC CTT G
BAT 40-UP-FAM	ATT AAC TTC CTA CAC CAC AAC
Mycl1-Down	CCT TTT AAG CTG CAA CAA TTT C
Mycl1-Up-NED	TGG CGA GAC TCC ATC AAA G
D18S58-Down	GCA GGA AAT CGC AGG AAC TT
D18S58-Up-FAM	GCT CCC GGC TGG TTT T
D10S197-Down	GTG ATA CTG TCC TCA GGT CTC C
D10S197-Up-Hex	ACC ACT GCA CTT CAG GTG AC

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

	MM 1 für 1 Reaktionen			
	$\mu$ l	Endkonzentration	Stammlösung	
H <sub>2</sub> O	13,6			
DMSO	1,5	5%	100%	
MgCL <sub>2</sub>	4,2	3,5mM	25mM	
10x Rx Buffer	3,0	1x	10x	

DNTPs	1,2	0,4mM	10mM	
Multimix	0,6	1x	50x	
Taq-Polymerase	0,9	0,15U/ $\mu$ l	5U/ $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>25,0</b>			
add <b>25,0</b> $\mu$ l MM to <b>5,0</b> $\mu$ l template DNA				

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über das PCR-Programm: TD 60/50 35 Zyklen:

94°C	2 min
94°C	1 min
50°C-60°C	1 min (10 Zyklen; pro Zyklus 1°C weniger)
72°C	1 min
94°C	1 min
50°C	1 min (25 Zyklen)
72°C	1 min
72°C	8 min

#### **2.2.4.1.9 Vorbereitung der Fragmentanalyse für den ABI 3100/310**

1  $\mu$ l des so gewonnenen PCR-Produktes wurde zusammen mit 12  $\mu$ l HiDi- Formamid und 0,7  $\mu$ l HD ROX 400 (Standard) 3 Minuten bei 94°C denaturiert und auf den Sequenzer geladen.

#### **2.2.4.1.10 Datenauswertung am Sequenzer**

Bei der Auswertung am ABI 3100/310 ist die Größe und Farbe des PCR-Produktes zu beachten:

D13S153	ca. 220 BP	grün
BAT 40	ca. 120 BP	blau
Mycl1	ca. 160-175 BP	schwarz
D18S58	ca. 145-160 BP	blau
D10S197	ca. 162-170 BP	grün

#### **2.2.4.1.11 Einzel-PCR**

Falls die Multimix-PCR kein brauchbares Ergebnis lieferte, wurden die Primer aus dem 1. oder 2. Panel einzeln pipettiert.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des dafür verwendeten PCR-Ansatzes:

	MM 1 für 1 Reaktionen			
	µl	Endkonzentration	Stammlösung	
H <sub>2</sub> O	17,2			
DMSO	1,5	5%	100%	
MgCL <sub>2</sub>	1,8	1,5mM	25mM	
10x Rx Buffer	3,0	1x	10x	
dNTPs	0,6	0,2mM	10mM	
<i>Primer</i>	0,8	0,5µM	20µM	
Taq-Polymerase	0,1	0,02U/µl	5U/µl	
<b>total</b>	<b>25,0</b>			

add 25,0 µl MM to 5,0 µl template DNA

PCR-Programm für Einzel-Primer, 1. Panel:

94°C	2 min
94°C	1 min
55°C	1 min (45 Zyklen)
72°C	1 min

PCR-Programm für Einzel-Primer, 2. Panel:

94°C	2 min
94°C	1 min
50°C-60°C	1 min (10 Zyklen; pro Zyklus 1°C weniger)
72°C	1 min
94°C	1 min
50°C	1 min (25 Zyklen)
72°C	1 min
72°C	8 min



### **2.2.4.2 Befunden der PCR-Ergebnisse**

Die Interpretation der PCR-Ergebnisse erfolgte durch zwei verschiedene Personen.

Widersprüchliche oder unklare Befunde wurden gemeinsam diskutiert und erforderten bei bleibenden Zweifeln eine Wiederholung der PCR entweder eines oder beider Panel, eine zusätzliche Einzel-PCR oder in Ausnahmefällen eine neue DNA-Isolation. Bei der Auswertung galten folgende Regeln:

- Um eine Aussage über den MS-Status eines Tumors machen zu können, wurde jedes Karzinom mit dem dazugehörigen Normalgewebe verglichen. Die beiden Kurven waren auf dem Ausdruck des Sequenzers für jeden Marker untereinander aufgetragen, was den direkten Vergleich erlaubte.
- Die Paare aus Normalgewebe und Tumor der verschiedenen Primer waren nacheinander auf den Ausdrucken aufgelistet. So konnten die einzelnen Marker nacheinander interpretiert werden.
- Um untereinander vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde jeder Marker eindeutig interpretiert, indem ihm eine bestimmte Zahl zugeordnet wurde.
- „0“ stand für MSS mit 2 Allelen und damit für einen informativen Befund: Normalgewebe und Tumor zeigten das gleiche Allelbild; es traten keine anderen Peaks auf.
- „1“ stand für MSI: Im Tumor traten neue Muster auf, die im korrespondierenden Normalgewebe fehlten.
- „2“ stand für LOH: Die Höhendifferenz der beiden Allele im Tumor und Normalgewebe hatte sich verändert, was für den Verlust eines Allels spricht. Meist waren LOHs bereits mit bloßem Auge erkennbar. In Fällen, die weniger eindeutig waren, konnte man eine Berechnung durchführen: Man bildete den Quotienten aus dem Größenverhältnis der beiden Allele im Normalgewebe und dem Größenverhältnis der beiden Allele im Tumor. Ergab sich dabei ein Wert kleiner 0,5 oder größer 2 wurde das Ergebnis als LOH gewertet. Teilweise ergaben sich grenzwertige Befunde wie z. B. der Wert 0,6 oder 1,9. In solchen Fällen wurde eine „2?“ dokumentiert und der berechnete Wert separat vermerkt.
- „3“ stand für MSS mit einem Allel und galt damit bezüglich eines LOH als nicht informativ. Eine Mikrosatelliteninstabilität kann auch bei Markern festgestellt werden, die nur ein Allel darstellen.
- „nd“ bedeutete, dass keine Interpretation der Ergebnisse möglich war. In Ausnahmefällen konnte keine PCR durchgeführt werden, da keine DNA mehr vorhanden war. Ziel war es jedoch, so selten wie möglich eine fehlende Interpretationsmöglichkeit zu

belassen. Schließlich konnten von jedem Tumor ausreichend viele Marker ausgewertet werden, so dass sich in jedem Fall eine eindeutige Aussage bezüglich des Mikrosatellitenstatus treffen ließ.

- Die Zahlen wurden zuerst per Hand in einer vorgefertigten Tabelle und später in einer Excel-Tabelle dokumentiert.

### **2.2.5 Immunhistologie der Mismatchreparaturen**

Eine weitere Methode, die vor allem bei MSI-Tumoren eine wichtige Rolle spielt, ist die immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression der Mismatchreparaturen hMLH1, hMSH2 und hMSH6. Von einem Großteil der mit FISH untersuchten Karzinome standen daraus gewonnene Daten zur Verfügung.

Dafür wurden drei Paraffinleerschnitte jedes Tumors benötigt. Die immunhistologische Färbung erfolgte maschinell am Ventana-Gerät. Dazu wurden folgende Antikörper verwendet:

- MLH1-Antikörper: Isotype: Mouse IgG; Verdünnung: 1:75; Aufbewahrung: -20°C
- MSH2-Antikörper: Isotype: Mouse IgG; Verdünnung: 1:100; Aufbewahrung: Kühlschrank
- MSH6-Antikörper: Isotype: Mouse IgG; Verdünnung: 1:150; Aufbewahrung: -20°C

### **2.2.6 Molekularbiologische Daten**

Die Expression von Maspin im Zellkern war bei einem Teil der Tumoren bereits in vorausgegangenen Arbeiten ermittelt worden (Dietmaier et al., 2006). Mittels Immunhistochemie wurde die Maspin-Protein-Expression im Zellkern untersucht. Als „Maspin“-positiv wurde ein Tumor dann gewertet, wenn mindestens 10% der Zellen eine deutliche Färbung zeigten.

Ebenso lagen von einem Teil der Fälle Ergebnisse zum „CIMP-Pathway“ vor. „CIMP-negative“-Tumoren zeigten keine Methylierung oder maximal eine Genmethylierung von „CpG islands“ des MLH1-Promoters, „CIMP-positive“-Tumoren hatten dagegen mehr als ein methyliertes Gen (Bettstetter et al., 2007).

Des Weiteren lagen Daten zur Akkumulation von  $\beta$ -catenin im Zellkern vor. Unterschieden wurde zwischen einer Akkumulation von 1%, 2%,  $\geq 10\%$  und  $> 70\%$ .

Auch das Vorhandensein oder Fehlen einer Promotormethylierung von hMLH1, p14, p15 und p16 wurde mit in die Auswertung einbezogen.

Auf die Beschreibung der praktischen Durchführung zur Ermittlung der oben genannten Daten wird verzichtet, da diese aus vorausgegangenen Arbeiten entnommen wurden.

## **2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische und graphische Datenanalyse erfolgte mit SPSS. Als Signifikanztest wurde der zweiseitige exakte Test nach Fisher verwendet. Das Ergebnis galt als statistisch signifikant bei p-Werten  $<0,05$ .

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Patientengut**

Es wurden kolorektale Karzinome von insgesamt 50 Patienten untersucht. Davon waren 28 (56%) MSS- und 22 (44%) MSI-Tumoren.

Die klinisch-pathologischen Parameter waren bei den Tumoren wie folgt verteilt:

**Tumorstadium**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	T1	3	6,0	6,1	6,1
	T2	9	18,0	18,4	24,5
	T3	26	52,0	53,1	77,6
	T4	11	22,0	22,4	100,0
	Gesamt	49	98,0	100,0	
Fehlend	System	1	2,0		
Gesamt		50	100,0		

**Tab. 3: Verteilung des Primärtumor-Stadiums (T1-T4)**

**N-Status**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	26	52,0	53,1	53,1
	1	9	18,0	18,4	71,4
	2	14	28,0	28,6	100,0
	Gesamt	49	98,0	100,0	
Fehlend	System	1	2,0		
Gesamt		50	100,0		

**Tab. 4: Verteilung des Lymphknoten-Status (N0-N2)**

**Lokalisation**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	rechts	24	48,0	49,0	49,0
	transversum	2	4,0	4,1	53,1
	C. descendens, Sigma, Rektum	23	46,0	46,9	100,0
	Gesamt	49	98,0	100,0	
Fehlend	System	1	2,0		
Gesamt		50	100,0		

**Tab. 5: Verteilung der Tumorlokalisation (rechts, C.transversum, links)****Grading**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	G2	26	52,0	52,0	52,0
	G3	24	48,0	48,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 6: Verteilung des Tumorgradings (G2, G3)****Alter > 60**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nein	19	38,0	38,0	38,0
	ja	31	62,0	62,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 7: Verteilung des Patientenalters (<60J; >60J)****Geschlecht**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	"m"	29	58,0	58,0	58,0
	"w"	21	42,0	42,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 8: Verteilung des Geschlechts (m, w)****OS Status**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	lebt	32	64,0	64,0	64,0
	verstorben	18	36,0	36,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 9: Verteilung des Überlebensstatus (lebt, verstorben)****3.2 Definition der CIN**

Um die 50 kolorektalen Karzinome hinsichtlich ihrer genetischen Instabilität differenzieren zu können, galt es zuerst, die Definition der chromosomalen Instabilität (CIN) festzulegen.

### **3.2.1 Definition der CIN im Normalgewebe**

Als Vergleich wurden sechs Proben Normalgewebe untersucht. Hier wurden je 200 Zellen ausgewertet, so dass insgesamt 1200 gesunde Zellen dem Tumorgewebe gegenübergestellt werden konnten. Es wurden sowohl die Einzelproben als auch die 1200 Zellen insgesamt analysiert.

Von jedem Centromer (CEP3, CEP7, CEP17) sowie vom Lokus 9p21 wurde die Zahl an Signalen pro Zellkern gezählt. Aus einer Gesamtzahl von 1200 Zellen wurden dann Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Dabei ergaben sich folgende Werte:

MW CEP7	SD CEP7	MW CEP3	SD CEP3	MW CEP17	SD CEP17	MW 9p21	SD 9p21
2,01416667	0,23596406	2,07416667	0,31688534	2,01	0,26132402	1,925	0,44295053

**Tab. 10: Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) für jedes Centromer und 9p21 im Normalgewebe (bezogen auf 1200 Normalzellen)**

Außerdem wurde für jeden Marker in jeder Einzelzelle festgelegt, ob ein „CIN-Event“, also eine chromosomale Alteration, vorlag oder nicht. Dies galt als erfüllt, wenn die Anzahl der Signale pro Zelle größer als zwei war. Der prozentuale Anteil an Zellen mit einem positiven „CIN-Event“ bezogen auf 1200 Zellen lag bei den verschiedenen Centromeren im Normalgewebe bei folgenden Werten:

% Zellen CEP7 CIN event	% Zellen CEP3 CIN event	% Zellen CEP17 CIN event
2,83333333	8,3333	3,25

**Tab. 11: Prozent an Zellen mit einem positiven „CIN-Event“ im Normalgewebe für jedes Centromer (bezogen auf 1200 Normalzellen)**

Bei 9p21 beurteilte man den prozentualen Anteil an Zellen mit einem „LOH-Event“. Dazu wurde in jeder einzelnen Zelle der Mittelwert aus den Signalzahlen der drei Centromermarker berechnet. Dann wurde die Differenz aus diesem Mittelwert und der Signalzahl von 9p21 in jeder Zelle gebildet. War der damit errechnete Wert  $\geq 1$ , dann lag in dieser Zelle ein 9p21-LOH vor. 2,00 % der insgesamt 1200 Normalzellen hatten einen „LOH-Event“.

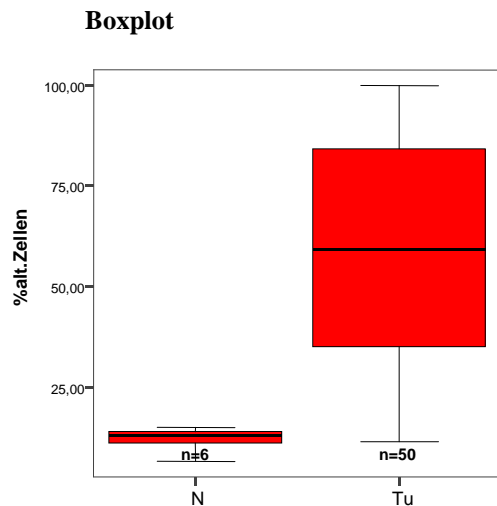
### **3.2.2 Definition der CIN im Tumorgewebe**

Um das Tumorgewebe mit dem Normalgewebe vergleichen zu können, wurden hier analoge Definitionen für die chromosomale Instabilität herangezogen und in Bezug zu den Ergebnissen im Normalgewebe gesetzt.

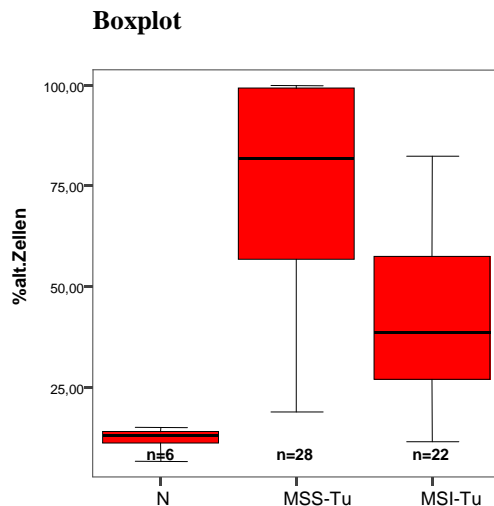
Auch bei den Karzinomen wurden von jedem Centromer (CEP3, CEP7, CEP17) sowie von 9p21 Mittelwert und Standardabweichung der Signalzahl pro Zelle bestimmt. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Mittelwerte im Tumorgewebe:

Tab.12: Mittelwerte der Signalzahl von CEP3, CEP7, CEP17 und 9p21 bei den einzelnen Tumoren				
ID	CEP3	CEP7	CEP17	9p21
	MW	MW	MW	MW
1	2,26	2,69	2,20	1,80
2	2,28	2,12	2,12	2,09
3	2,24	2,04	1,97	1,91
4	2,67	2,12	2,05	2,16
5	2,13	2,04	2,01	2,01
6	2,48	2,01	1,99	1,82
7	2,09	2,15	2,30	2,03
8	2,19	2,01	1,98	2,03
9	2,17	2,04	2,14	1,88
10	2,22	2,07	2,02	1,38
11	2,14	2,03	2,16	2,04
12	2,17	2,02	2,07	1,89
13	2,40	2,33	2,39	2,26
14	2,48	2,09	2,01	1,76
15	2,06	2,07	2,07	1,84
16	2,07	2,74	2,00	2,12
17	3,23	3,23	3,23	3,07
18	2,08	2,01	1,97	2,06
19	2,68	2,74	2,34	2,36
20	2,62	2,39	2,41	1,96
21	2,31	3,44	2,50	2,60
22	2,29	2,09	2,07	2,04
23	2,21	2,40	2,01	2,07
24	2,75	2,27	2,28	2,24
25	2,63	2,18	2,06	2,14
26	3,13	4,02	3,85	3,45
27	3,01	2,69	2,45	2,43
28	4,05	5,34	3,92	4,02
29	2,32	2,72	2,11	2,12
30	2,19	2,46	1,99	2,07
31	3,49	3,86	3,27	1,82
32	3,04	4,24	2,85	1,33
33	3,07	3,67	3,71	2,97
34	3,28	3,97	3,04	2,25
35	2,97	2,93	2,32	2,07
36	3,55	2,21	3,38	3,03
37	2,52	3,29	2,43	2,30
38	4,01	5,76	4,12	2,57
39	3,08	3,97	3,48	2,44
40	2,96	2,08	2,01	2,00
41	2,03	2,44	1,96	2,03
42	2,71	2,50	2,58	2,18
43	2,18	2,12	2,07	1,76
44	2,93	3,12	2,61	2,92
45	2,26	2,30	2,27	2,12
46	2,23	2,11	2,18	1,68
47	3,01	2,50	2,33	2,33
48	3,95	4,42	3,32	2,51
49	2,09	2,07	2,06	1,53
50	3,47	4,87	3,58	3,29

Für jeden der 50 Tumore sowie für die sechs Normalgewebe wurde der prozentuale Anteil an alterierten Zellen ermittelt. Dazu wurde die Signalzahl für jedes der drei Centromere in jeder Zelle bestimmt. Lag diese über zwei galt dies als „CIN-Event“. So wurde festgelegt, ob in einer Zelle auf einem oder mehreren der Centromermarker ein „CIN-Event“ vorlag. Die so ermittelte Zahl an Zellen mit mindestens einem „CIN-Event“ wurde durch die insgesamt pro Tumor ausgewertete Zellzahl geteilt und man erhielt so für jeden Tumor die Prozentzahl alterierter Zellen. Bei den sechs Normalgeweben wurde identisch verfahren.



**Abb.1: Vergleich % alt. Zellen in 6 Normalgeweben und 50 Tumorgeweben**



**Abb.2: Vergleich % alt. Zellen in 6 Normalgeweben, 28 MSS- und 22 MSI-Tumoren**

Die Kastengrafiken (Abb.1 und 2) machen deutlich, dass der prozentuale Anteil alterierter Zellen im Normalgewebe deutlich kleiner ist als im Tumorgewebe. Der Median, dargestellt als durchgehender Strich in der Box, beträgt im Normalgewebe 12,75% und im Tumorgewebe 59,06%.

Die Box, die dem Bereich entspricht, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen, ist im Tumorgewebe deutlich größer. Die Werte, die außerhalb der Box liegen und durch die „Whisker“ dargestellt werden, zeigen wie unterschiedlich der prozentuale Anteil an alterierten Zellen bei den einzelnen Tumoren ist (zwischen 11,5% und 100%) und wie klein dieser Bereich im Normalgewebe ist (zwischen 6,5% und 15,00%).

In Abb.2 werden zusätzlich MSS- und MSI-Tumore unterschieden. Bereits hier wird deutlich, dass auch MSI-Tumore alterierte Zellen haben, wenn auch im Durchschnitt weniger ausgeprägt als MSS-Tumoren (vgl. die jeweiligen Mediane von 38,34% bei den MSI-Tumoren bzw. 81,5% bei den MSS-Tumoren). Allerdings scheinen Einzelfälle zum Teil deutlich alteriert zu sein (vgl. oberer „Whisker“ der MSI-Tu-Box, entsprechend einer Alteration von 82,50% der Zellen dieses Tumors).



Es wurden drei Gruppen von Tumoren unterschieden: Karzinome, die keine chromosomale Instabilität zeigten („CIN-negativ“), solchen mit geringer chromosomaler Instabilität („CIN-low“) und solche mit hoher chromosomaler Instabilität („CIN-high“). Wie die Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen erfolgte, wird nun erläutert.

Es wurden zwei verschiedene Anhaltspunkte verfolgt.

Zum Einen wurde der Mittelwert der gezählten Signale pro Zelle für jedes Centromer in jedem Tumor berechnet. Ebenso wurden Mittelwert und ein- sowie zweifache Standardabweichung für jedes Centromer im Normalgewebe bestimmt.

Ein „CIN-Event“ lag vor, wenn der berechnete Mittelwert für die Signalzahl eines Centromers im Tumor außerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  einfache Standardabweichung lag. Vergleichend wurde eine zweite Definition herangezogen, laut der der Mittelwert für die Signalzahl eines Centromers im Tumor außerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  zweifache Standardabweichung lag.

„CIN-negative“-Tumoren erfüllten für keinen der drei Centromermarker die genannte Definition eines „CIN-Events“, „CIN-low“-Tumoren erfüllten sie bei genau einem Centromermarker und „CIN-high“-Tumoren bei zwei oder drei Centromermarker. Folgende Tabellen geben einen Überblick über die Verteilung der Tumorgruppen abhängig von der gewählten Definition:

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig CIN-neg.	14	28,0	28,0	28,0
CIN-low	13	26,0	26,0	54,0
CIN-high	23	46,0	46,0	100,0
Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 13: Verteilung der CIN-Tumorgruppen bei der Def. CEPsMWert $>1 \times SD$**

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig CIN-neg.	25	50,0	50,0	50,0
CIN-low	8	16,0	16,0	66,0
CIN-high	17	34,0	34,0	100,0
Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 14: Verteilung der CIN-Tumorgruppen bei der Def. CEPsMWert $>2 \times SD$**

Der zweite Ansatzpunkt war folgender: Im Normalgewebe wurde für jeden Centromermarker der prozentuale Anteil an Zellen ermittelt, die mehr als zwei Signale aufwiesen (vgl. Tab.11).

Auch bei den Tumoren wurde der prozentuale Anteil an Zellen mit mehr als zwei Signalen für jeden Centromermarker ermittelt, was wiederum als „CIN-Event“ bezeichnet wurde.

„CIN-positiv“ auf dem jeweiligen Centromer war ein Tumor dann, wenn der prozentuale Anteil an Zellen mit mehr als zwei Signalen zweimal so groß war wie im Normalgewebe. Um die „beste“ „CIN-Definition“ zu finden, wurde auch die Verteilung der verschiedenen Gruppen ermittelt, wenn man als Bedingung stellte, dass der prozentuale Anteil an Zellen mit mehr als zwei Signalen dreimal und viermal so groß sein musste wie im Normalgewebe.

Ein Tumor wurde als „CIN-negativ“ bezeichnet, wenn bei keinem der drei Centromere (CEP3, CEP7, CEP17) der prozentuale Wert der Zellen mit alterierter Centromerenzahl im Tumorgewebe über dem zwei-, drei-, bzw. vierfachen Wert des prozentualen Anteils der alterierten Zellen im Normalgewebe lag.

„CIN-low“-Karzinome zeigten bei genau einem der drei Centromere eine Instabilität laut der oben genannten Definition und „CIN-high“-Tumoren bei zwei oder drei Centromeren.

Folgende Tabellen sollen wieder einen Überblick über die Verteilung in die drei Tumorgruppen abhängig von der gewählten Definition geben:

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	CIN-neg.	2	4,0	4,0	4,0
	CIN-low	7	14,0	14,0	18,0
	CIN-high	41	82,0	82,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 15: Verteilung der CIN-Tumorgruppen bei der Def. %Zellen CEPs>2x%NG**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	CIN-neg.	7	14,0	14,0	14,0
	CIN-low	11	22,0	22,0	36,0
	CIN-high	32	64,0	64,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

**Tab. 16: Verteilung der CIN-Tumorgruppen bei der Def. %Zellen CEPs>3x%NG**

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	CIN-neg.	10	20,0	20,0	20,0
	CIN-low	12	24,0	24,0	44,0
	CIN-high	28	56,0	56,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	100,0	

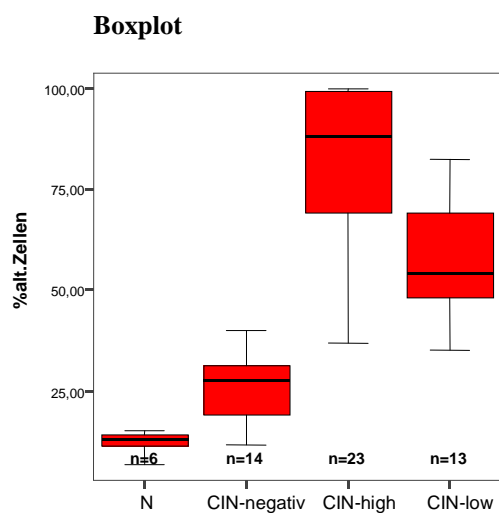
**Tab. 17: Verteilung der CIN-Tumorgruppen bei der Def. %Zellen CEPs>4x%NG**

Für die endgültige Auswertung wurden nur zwei der fünf beschriebenen Definitionen für chromosomale Instabilität verwendet:

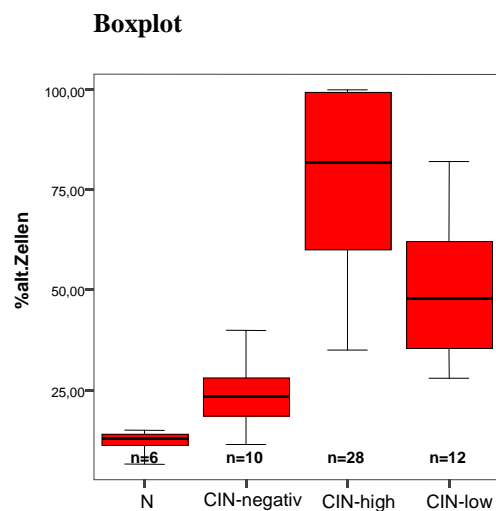
1. Eine chromosomale Instabilität lag vor, wenn der berechnete Mittelwert für die Signalzahl eines Centromers pro Zelle im Tumor außerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  einfache Standardabweichung lag.
2. Eine chromosomale Instabilität lag vor, wenn in einem Tumor der prozentuale Anteil an Zellen mit mehr als zwei Signalen für ein oder mehr Centromere viermal so groß war wie im Normalgewebe.

Die Verteilung der oben genannten „CIN-Gruppen“ zeigt auf, dass diese Definitionen am sinnvollsten sind. Würde man alle Tumoren als „CIN-positiv“ bezeichnen, deren prozentualer Anteil alterierter Zellen zweimal größer ist als im Normalgewebe (vgl. Tab.15), hätte man durch die knappe Wahl des „Normalbereiches“ zu viele Tumoren, die als „CIN-high“ (82%) klassifiziert würden und nur 4% wären dann „CIN-negativ“. Würde man andererseits einen Tumor nur dann als „CIN-positiv“ bezeichnen, wenn der Mittelwert außerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  zweifache Standardabweichung liegt, würden 50% Karzinome als „CIN-negativ“ gelten (vgl. Tab.14), weil der „Normalbereich“ zu weit gewählt wäre.

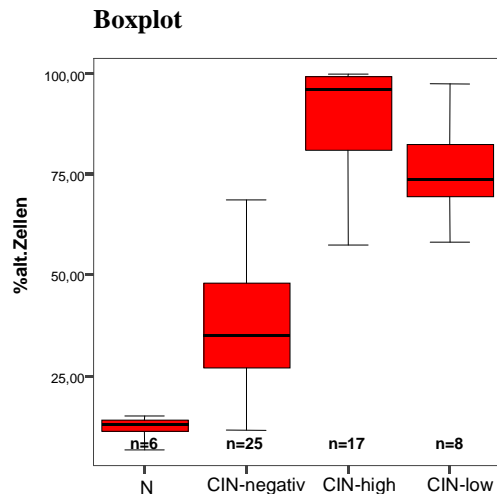
Folgende Grafiken zeigen die prozentuale Verteilung alterierter Zellen innerhalb den verschiedenen „CIN-Gruppen“ je nach verwendeter Definition:



**Abb.3: % alt. Zellen in 6 Normal- und 50 Tumorgeweben (bei CIN-Def.MWert>1xSD)**



**Abb.4: % alt. Zellen in 6 Normal- und 50 Tumorgeweben (bei CIN-Def.%Zellen>4x%NG)**



**Abb.5: % alt. Zellen in 6 Normal- und 50 Tumorgeweben (bei CIN-Def.MWert>2xSD)**

Der vierte Marker p16(9p21) spielte in der CIN-Definition keine Rolle. Hier wurde zwar ebenfalls ermittelt, ob der Mittelwert der gezählten Signale im Tumor innerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  ein- bzw. zweifache Standardabweichung lag, wichtiger war jedoch, analog zum Normalgewebe, die prozentuale Anzahl der Zellen mit einem „LOH-Event“ im Vergleich zum Normalgewebe.

Dazu wurde von 1200 Normalzellen die Signalzahl von p16(9p21) im Zellkern ermittelt. Aus der Signalzahl der drei CEPs wurde der Mittelwert gebildet. Dann wurde die Differenz aus diesem Mittelwert und der absoluten Signalzahl von p16(9p21) gezogen. Ein „LOH-Event“ lag definitionsgemäß dann vor, wenn diese Differenz  $\geq 1$  war. Daraus ermittelte man dann den prozentualen Anteil der „LOH-Events“ im Normalgewebe insgesamt. Dieser lag bei 2%. Genau identisch wurde mit jedem der Tumoren verfahren, so dass man am Ende für jeden Tumor einen prozentualen Anteil an Zellen mit „LOH-Events“ hatte.

Beide Werte wurden zueinander in Verbindung gesetzt und ein „LOH-Event“ auf dem p16(9p21)-Gen lag definitionsgemäß dann vor, wenn der prozentuale Anteil an LOHs im Tumorgewebe über dem vierfachen Wert des prozentualen Anteils der LOHs im Normalgewebe lag. Hätte man dagegen bereits dann von einem positiven „LOH-Event“ gesprochen, wenn der prozentuale Anteil an LOHs im Tumorgewebe über dem zwei- bzw. dreifachen Wert im Vergleich zum Normalgewebe lag, wären zu viele Karzinome falsch positiv für einen tatsächlichen „LOH-Event“ gewesen.

Eine homozygote p16(9p21)-Deletion lag dann vor, wenn kein Signal im Zellkern gezählt werden konnte. Auch hier wurde bei allen Normalzellen sowie in jedem Tumor der prozentuale Anteil an Zellen ermittelt, die eine homozygote p16-Deletion aufwiesen. Im Normalgewebe lag der Anteil bei 3,8%. Beide Prozentwerte wurden wiederum zueinander in Verbin-

### 3. Ergebnisse 3.3 CIN in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

dung gesetzt und eine homozygote p16-Deletion lag vor, wenn der prozentuale Anteil im Tumor über dem vierfachen Wert des prozentualen Anteils im Normalgewebe lag.

### **3.3 CIN in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Mit beiden oben genannten CIN-Definitionen wurde eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern durchgeführt.

Folgende Kriterien wurden bzgl. ihrer Beziehung zur chromosomalen Instabilität geprüft: Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Tumorlokalisation, Differenzierungsgrad, Alter und Geschlecht der Patienten sowie Überlebensrate.

Tab.18: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
<b>Tu-Stadium<sup>2</sup></b>	49	100,00%	13	26,53%	13	26,53%	23	46,94%	0,750
T1	3	6,12%	1	2,04%	0	0,00%	2	4,08%	
T2	9	18,37%	2	4,08%	4	8,16%	3	6,12%	
T3	26	53,06%	6	12,24%	6	12,24%	14	28,57%	
T4	11	22,45%	4	8,16%	3	6,12%	4	8,16%	
<b>N-Status<sup>2</sup></b>	49	100,00%	13	26,53%	13	26,53%	23	46,94%	0,042
N0	26	53,06%	9	18,37%	3	6,12%	14	28,57%	
N1	9	18,37%	1	2,04%	6	12,24%	2	4,08%	
N2	14	28,57%	3	6,12%	4	8,16%	7	14,29%	
<b>Tu-Lokalisation</b>	49	100,00%	14	28,57%	13	26,53%	22	44,90%	0,450
proximal	24	48,98%	5	10,20%	9	18,37%	10	20,41%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	0	0,00%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	8	16,33%	4	8,16%	11	22,45%	
<b>Grading</b>	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,339
G2	26	52,00%	5	10,00%	7	14,00%	14	28,00%	
G3	24	48,00%	9	18,00%	6	12,00%	9	18,00%	
<b>Alter</b>	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,142
< 60 J	19	38,00%	4	8,00%	8	16,00%	7	14,00%	
> 60 J	31	62,00%	10	20,00%	5	10,00%	16	32,00%	
<b>Geschlecht</b>	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,151
m	29	58,00%	5	10,00%	9	18,00%	15	30,00%	
w	21	42,00%	9	18,00%	4	8,00%	8	16,00%	
<b>Überleben</b>	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	1,000
lebt	32	64,00%	9	18,00%	8	16,00%	15	30,00%	
verstorben	18	36,00%	5	10,00%	5	10,00%	8	16,00%	
<b>Überlebensrate</b>	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,929
>36 Monate	33	66,00%	10	20,00%	8	16,00%	15	30,00%	
<=36 Monate	17	34,00%	4	8,00%	5	10,00%	8	16,00%	

<sup>1</sup>CIN-Status(CEPsMWert>1xSD); <sup>2</sup>nach UICC

### 3. Ergebnisse 3.3 CIN in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Tab.19: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
Tu-Stadium <sup>2</sup>	49	100,00%	10	20,41%	11	22,45%	28	57,14%	0,820
T1	3	6,12%	0	0,00%	1	2,04%	2	4,08%	
T2	9	18,37%	2	4,08%	2	4,08%	5	10,20%	
T3	26	53,06%	4	8,16%	6	12,24%	16	32,65%	
T4	11	22,45%	4	8,16%	2	4,08%	5	10,20%	
N-Status <sup>2</sup>	49	100,00%	10	20,41%	11	22,45%	28	57,14%	0,126
N0	26	53,06%	7	14,29%	4	8,16%	15	30,61%	
N1	9	18,37%	0	0,00%	5	10,20%	4	8,16%	
N2	14	28,57%	3	6,12%	2	4,08%	9	18,37%	
Tu-Lokalisation	49	100,00%	10	20,41%	12	24,49%	27	55,10%	0,753
proximal	24	48,98%	4	8,16%	7	14,29%	13	26,53%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	0	0,00%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	5	10,20%	5	10,20%	13	26,53%	
Grading	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,129
G2	26	52,00%	3	6,00%	5	10,00%	18	36,00%	
G3	24	48,00%	7	14,00%	7	14,00%	10	20,00%	
Alter	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,279
< 60 J	19	38,00%	3	6,00%	7	14,00%	9	18,00%	
> 60 J	31	62,00%	7	14,00%	5	10,00%	19	38,00%	
Geschlecht	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,122
m	29	58,00%	3	6,00%	7	14,00%	19	38,00%	
w	21	42,00%	7	14,00%	5	10,00%	9	18,00%	
Überleben	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,785
lebt	32	64,00%	6	12,00%	7	14,00%	19	38,00%	
verstorben	18	36,00%	4	8,00%	5	10,00%	9	18,00%	
Überlebensrate	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,848
>36 Monate	33	66,00%	7	14,00%	7	14,00%	19	38,00%	
<=36 Monate	17	34,00%	3	6,00%	5	10,00%	9	18,00%	

<sup>1</sup>CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG); <sup>2</sup>nach UICC

#### 3.3.1 CIN und Tumorstadium

Das Tumorstadium (pT) war bei 49 von 50 Patienten bekannt. Insgesamt zeigte sich ein deutliches Überwiegen der Karzinome im Stadium pT3 (26 von 49=53,06%) bei allen drei Gruppen von Tumoren. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der chromosomalen Instabilität ermittelt werden.

#### 3.3.2 CIN und Lymphknotenbefall

Daten über den N-Status lagen ebenfalls bei 49 von 50 Patienten vor. Der Großteil der untersuchten Karzinome war nodal negativ (N0: 26 von 49=53,06%). Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem „CIN-Status“ und dem Lymphknotenbefall für die Definition „CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)“ (CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)\*N-Status, p=0,042). Bei „CIN-negativ“ und „CIN-high“ überwogen N0- und N2-Tumoren; bei „CIN-low“ kamen am häufigsten N1-Tumoren vor, welche bei den anderen am seltensten waren. Dieser Zusammenhang zwischen „CIN-low“-Tumoren und N1 bestätigte sich auch, wenn man nur „CIN-low“-Tumoren mit nicht „CIN-low“-, also mit allen „CIN-negativ“- und

### 3. Ergebnisse \_\_\_\_\_ 3.3 CIN in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

„CIN-high“-Tumoren insgesamt verglichen (CIN-low (CEPs MWert > 1xSD) \* N-Status,  $p=0,006$ ).

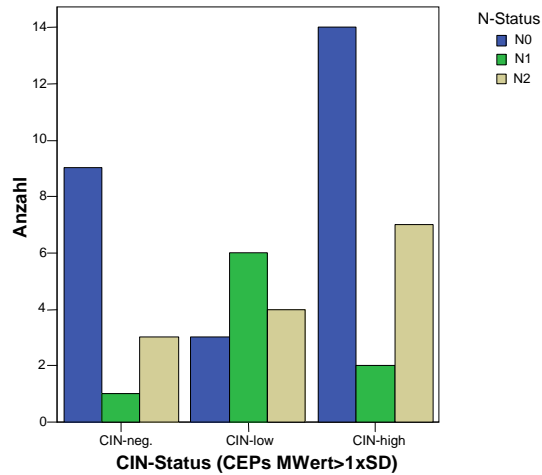


Abb.6: Korrelation zwischen chromosomaler Instabilität und Lymphknotenbefall,  $p=0,042$

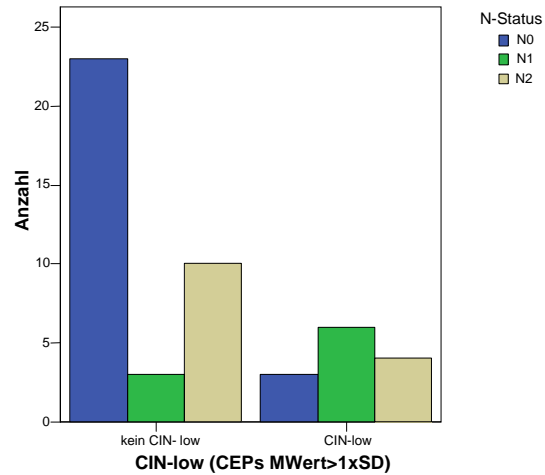


Abb.7: Korrelation zwischen CIN-low-Tu und Lymphknotenbefall,  $p=0,006$

#### 3.3.3 CIN und Tumorlokalisation

Die Tumorlokalisation wurde bei 49 von 50 Fällen verwertet. Aufgrund eines synchronen Tumors, traten bei einem Fall sowohl eine proximale als auch eine distale Lokalisation auf, so dass dieser bei der Auswertung vernachlässigt wurde. Chromosomal instabile Tumoren vom „CIN-low“-Typ waren im Vergleich mit den anderen Tumorgruppen häufiger im proximalen Kolon lokalisiert. Dieser Zusammenhang war statistisch nicht signifikant.

#### 3.3.4 CIN und Differenzierungsgrad

Chromosomal instabile Tumore wiesen einen höheren Differenzierungsgrad auf als chromosomal stabile Tumore, wobei auch dieser Zusammenhang statistisch nicht signifikant war. So zeigten „CIN-high“-Tumoren überwiegend ein G2-Grading, „CIN-negative“-Karzinome waren häufiger G3-Tumoren und „CIN-low“-Tumoren lagen von der Verteilung des Differenzierungsgrads her dazwischen.

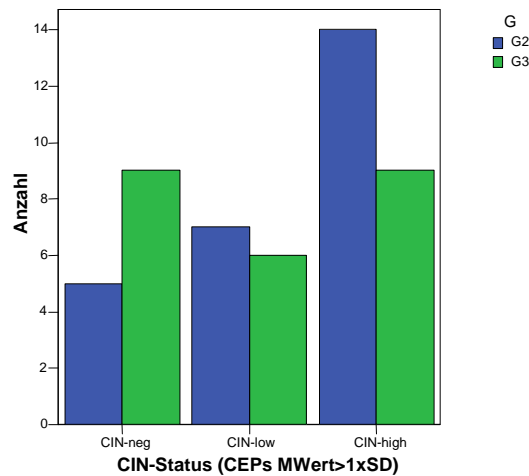


Abb.8: Korrelation zwischen chromosomaler Instabilität und Grading,  $p=0,339$

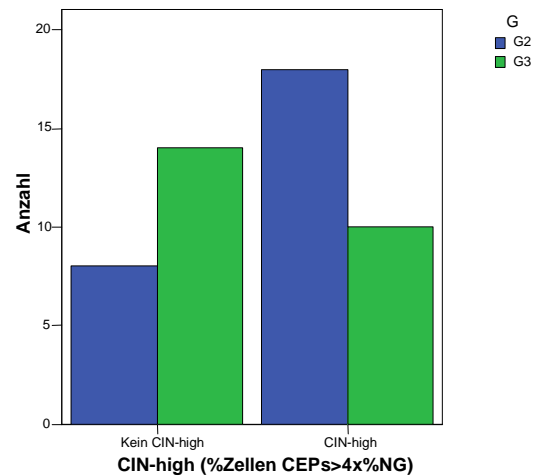


Abb.9: Korrelation zwischen CIN-high-Tu und Grading,  $p=0,086$

### 3.3.5 CIN und Alter

Die Patienten wurden in zwei Altersgruppen eingeteilt, je nachdem, ob sie zum Operationszeitpunkt älter oder jünger als 60 Jahre waren. Für „CIN-low“-Tumore zeigte sich, dass diese häufiger bei jüngeren Patienten unter 60 Jahren vorkamen. Dieser Zusammenhang war jedoch nur bei der Definition „CIN-Status (CEPs MWert > 1xSD)“ grenzwertig statistisch signifikant (CIN-low (CEPs MWert > 1xSD)\*Pat.-alter,  $p=0,054$ ).

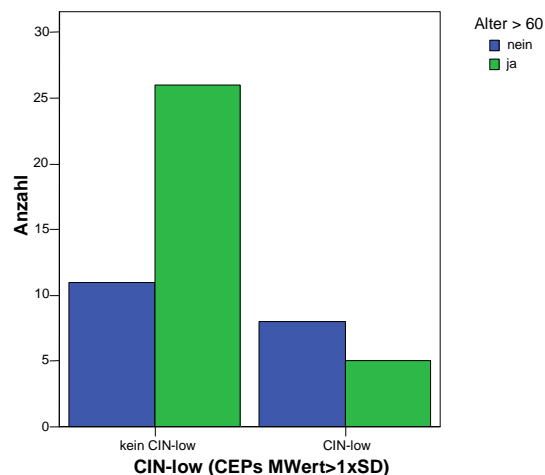


Abb.10: Korrelation zwischen CIN-low-Tu und Patientenalter,  $p=0,054$

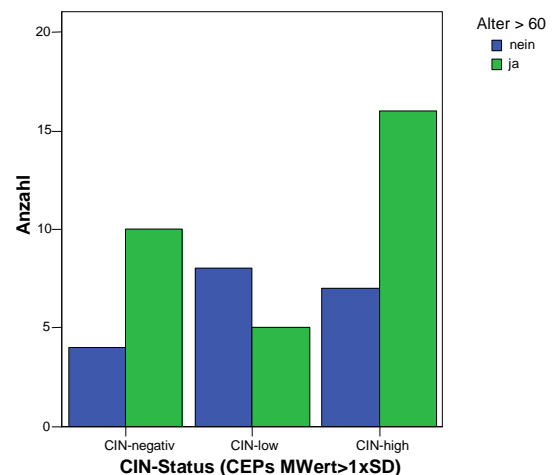


Abb.11: Korrelation zwischen CIN-Status und Patientenalter,  $p=0,142$



### 3.3.6 CIN und Geschlecht

„CIN-positive“-Tumoren korrelierten positiv mit dem männlichen Geschlecht, während „CIN-negative“-Karzinome mehr Frauen betrafen. Diese Zusammenhänge waren nicht statistisch signifikant.

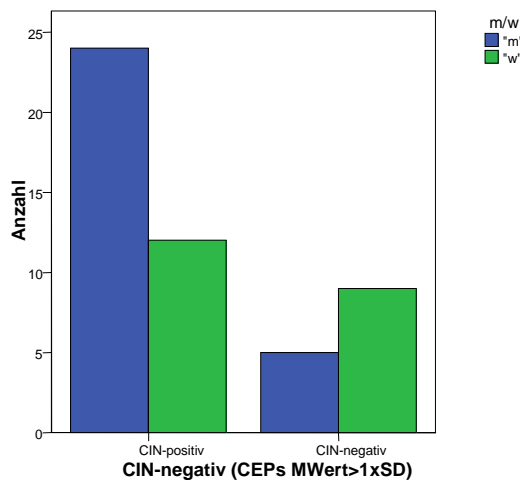


Abb.12: Korrelation zwischen CIN-negativen-Tu und Geschlecht,  $p=0,061$

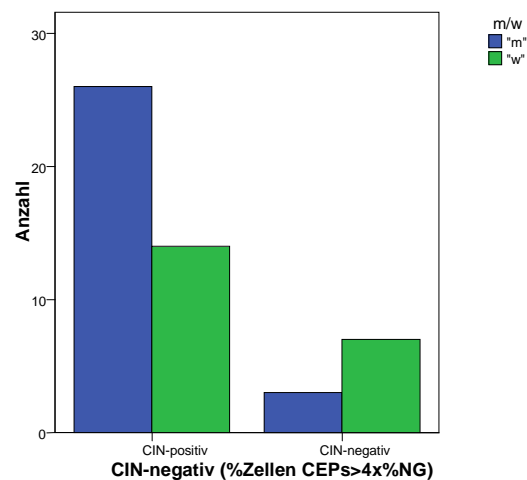


Abb.13: Korrelation zwischen CIN-negativen-Tu und Geschlecht,  $p=0,073$

### 3.3.7 CIN und Überlebensrate

Bezüglich der Überlebensrate wurden zwei verschiedene Definitionen betrachtet. Erstens der Überlebensstatus, das heißt, lebt der Patient zu einem bestimmten Zeitpunkt noch oder nicht, und zweitens, ob ein Überleben über oder unter 36 Monaten vorlag.

Statistisch signifikante Zusammenhänge ergaben sich hierbei nicht. Es überwog in allen drei Tumorgruppen der Anteil an Patienten, die noch lebten. Allerdings war der Nachbeobachtungszeitraum bei vielen Fällen zu kurz, um hier valide Ergebnisse erwarten zu können.

Bei der zweiten Definition ist zusätzlich zu beachten, dass sich der Datenstand auf den 30.09.2003 bezog und bei einem Teil der Patienten der Diagnosezeitpunkt weniger als 36 Monate zurücklag. Diesen wurde dann automatisch eine Überlebensrate  $\geq 36$  Monate zugewiesen, wovon natürlich nicht automatisch ausgegangen werden darf. Damit wurde die Gruppe der Patienten mit einem Überleben  $\geq 36$  Monaten (laut der oben genannten Definition) mit insgesamt 66% vermutlich zu groß bestimmt.

### **3.4 CIN in Korrelation mit molekularen Markern**

#### **3.4.1 CIN und MS-Status**

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war, herauszufinden, ob und wie die durch FISH ermittelte chromosomale Instabilität mit dem durch PCR-Analyse ermittelten MS-Status korrelierte. Folgende Zusammenhänge erwiesen sich als statistisch hoch signifikant: Karzinome bei denen man mittels FISH keine chromosomale Instabilität nachweisen konnte, waren fast ausschließlich MSI-Tumoren. Die mittels FISH als „CIN-high“ klassifizierten Karzinome, waren häufiger mikrosatellitenstabil (MSS). Interessanterweise stellten sich die als „CIN-low“ klassifizierten Karzinome als Übergangsgruppe dar, wobei auch hier MSI-Tumoren leicht überwogen (siehe Tab. 20-21 und Abb. 14-15). Betrachtete man die drei Gruppen einzeln, so ergaben sich nur für „CIN-negativ“ und „CIN-high“ statistisch signifikante Zusammenhänge. Da die „CIN-low“-Tumoren eine Art Zwischengruppe darstellten und sowohl mikrosatellitenstabil als auch -instabil sein konnten, fand man hier keine statistisch signifikante Korrelation mit MSS bzw. MSI (siehe Abb.16-21).

Tab.20: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
MSS	28	56,00%	3	6,00%	5	10,00%	20	40,00%	
MSI	22	44,00%	11	22,00%	8	16,00%	3	6,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)									

Tab.21: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
MSS	28	56,00%	1	2,00%	5	10,00%	22	44,00%	
MSI-high	22	44,00%	9	18,00%	7	14,00%	6	12,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									

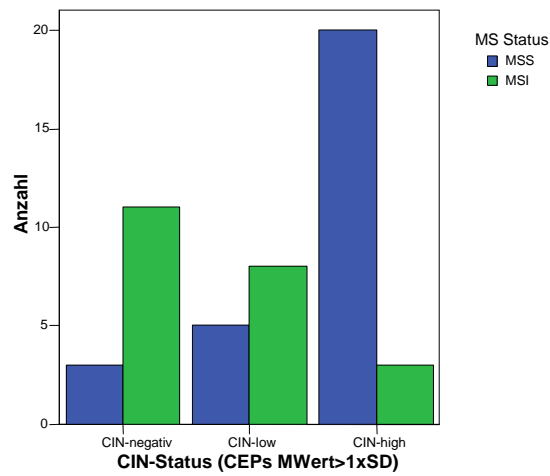


Abb.14: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status,  $p=0,000$

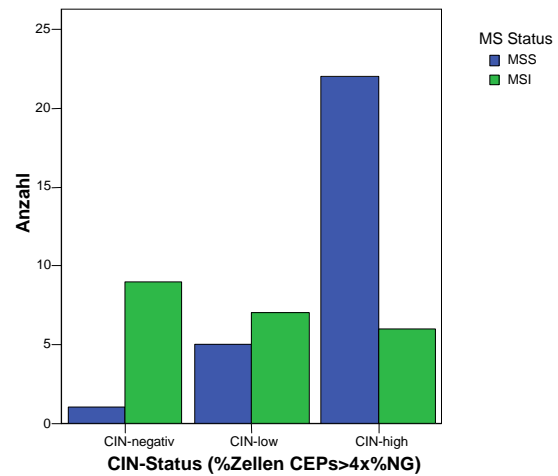


Abb.15: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status,  $p=0,000$

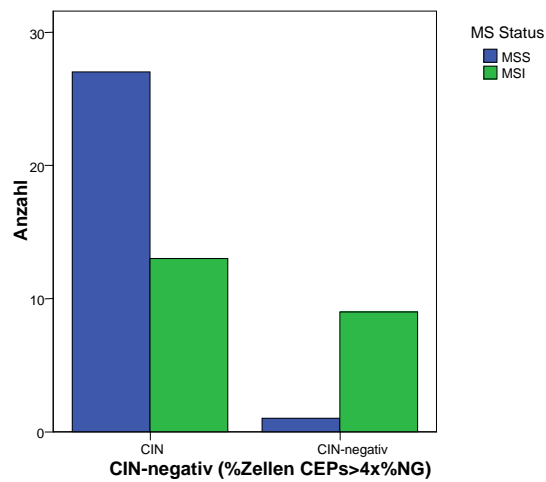


Abb.16: Korrelation zwischen CIN-negativen-Tu und MS-Status,  $p=0,003$

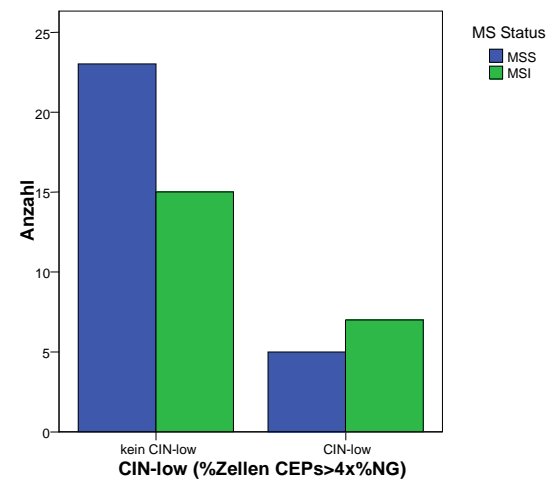
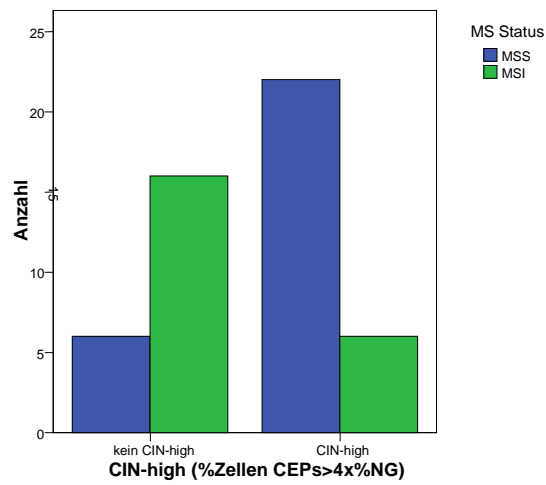
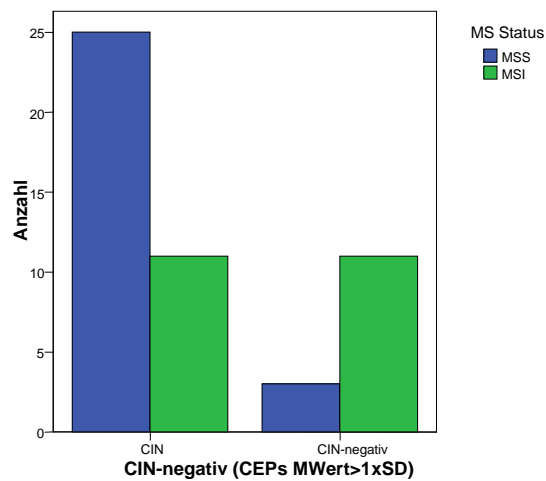


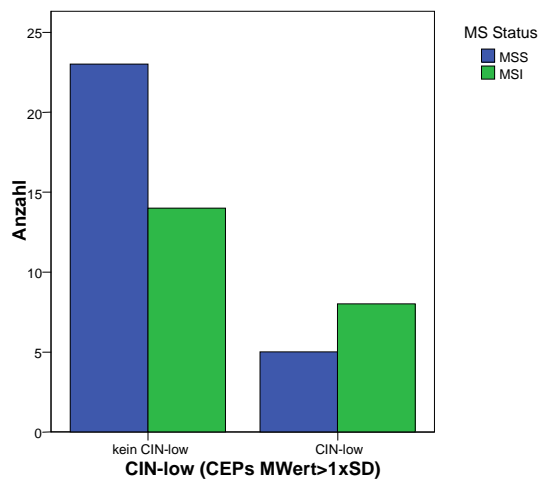
Abb.17: Korrelation zwischen low-CIN-Tu und MS-Status,  $p=0,324$



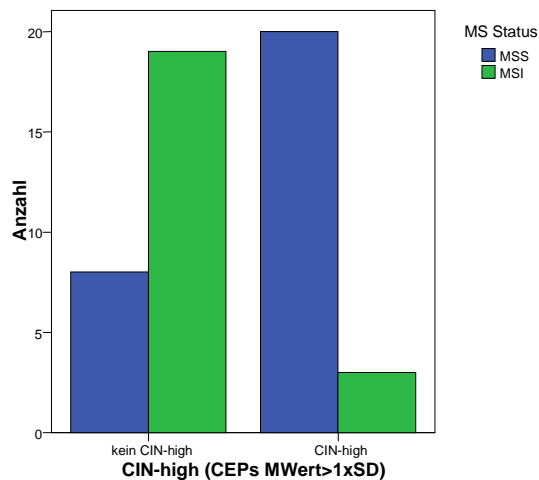
**Abb.18: Korrelation zwischen CIN-high-Tu und MS-Status,  $p=0,000$**



**Abb.19: Korrelation zwischen CIN-negativ-Tu und MS-Status,  $p=0,004$**



**Abb.20: Korrelation zwischen CIN-low-Tu und MS-Status,  $p=0,197$**



**Abb.21: Korrelation zwischen CIN-high-Tu und MS-Status,  $p=0,000$**

Unterschied man bezüglich des MS-Status neben MSI- und MSS-Tumoren noch MSI-low-Tumoren, zeigten sich folgende Zusammenhänge:

Zwar lag, je nach Wahl der CIN-Definition, die Betonung etwas mehr auf der Seite der Fälle ohne chromosomale Instabilität („CIN-negativ“) bzw. auf der Seite der „CIN-high“-Fälle, die Verteilung der MSS-, MSI-, und MSI-low-Tumoren war jedoch bei beiden Definitionen gleich: Karzinome ohne chromosomale Instabilität waren fast ausschließlich MSI-high (9 von 10 = 90% bzw. 11 von 14 = 78,57%). „CIN-high“-Tumore waren meist MSS (15 von 28 = 53,57% bzw. 13 von 23 = 56,52%). Allerdings fand sich bei „CIN-high“-Tumoren auch ein beträchtlicher Anteil an MSI-low- und MSI-high-Karzinomen. Die Gruppe der „CIN-low“-Tumoren bestand überwiegend aus MSI-high-Fällen (7 von 12 = 58,33% bzw. 8 von 13 = 61,54%), der Rest verteilte sich zwischen MSS- und MSI-low-Fällen mit leichter Betonung von MSS.

Tab.22: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,001
MSS	19	38,00%	3	6,00%	3	6,00%	13	26,00%	
MSI-high	22	44,00%	11	22,00%	8	16,00%	3	6,00%	
MSI-low	9	18,00%	0	0,00%	2	4,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)									

Tab.23: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,003
MSS	19	38,00%	1	2,00%	3	6,00%	15	30,00%	
MSI-high	22	44,00%	9	18,00%	7	14,00%	6	12,00%	
MSI-low	9	18,00%	0	0,00%	2	4,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									

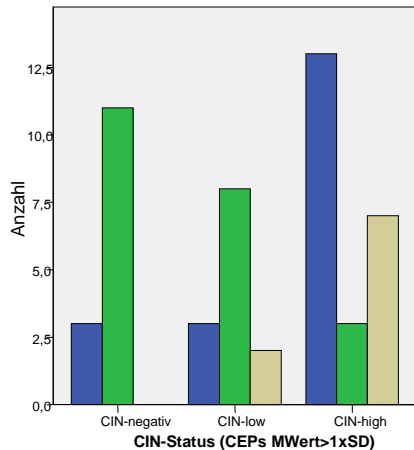


Abb.22: Korrelation von CIN-Status und MS-Status (MSS; MSI-high; MSI-low), p=0,001

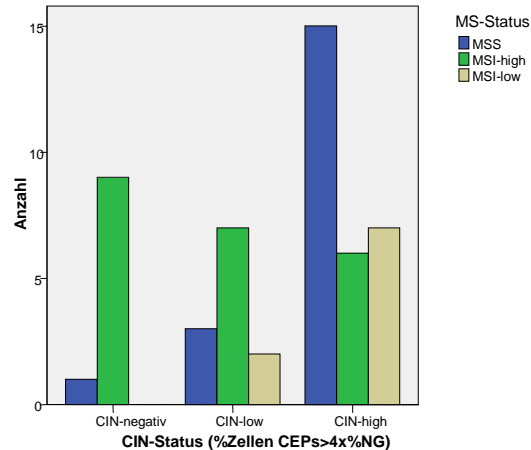


Abb.23: Korrelation von CIN-Status und MS-Status (MSS; MSI-high; MSI-low), p=0,003

### 3.4.2 CIN und MS-Einzelmarker

Die Übersichtstabellen Tab.24 und 25 hierzu finden sich im Anhang.

#### 3.4.2.1 BAT25, BAT26, BAT40

Für die Marker BAT25, BAT26 und BAT40 ergaben sich statistisch hoch signifikante Zusammenhänge zwischen dem CIN- und dem MS-Status. Die Verteilung in die verschiedenen Gruppen war dabei fast analog zum MS-Status insgesamt (siehe 3.4.1 und Tab.20-21).

#### 3.4.2.2 APC-d5s346

Es zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MS-Status von APC-d5s346 und den drei CIN-Gruppen für die Definition „CIN-Status (%Zellen CEPs>4x%NG)“ mit p=0,001. Bei „CIN-negativ“-Tumoren fanden sich fast ausschließlich MSI-Fälle (ein MSS; kein LOH), bei „CIN-low“-Tumoren fand sich eine langsam steigende Zahl von MSS- und LOH-Fällen und bei „CIN-high“-Tumoren war der Marker APC-d5s346 entweder mikrosatellitenstabil (MSS) oder zeigte einen LOH. Stellte man die „CIN-high“-Fälle den „nicht CIN-high“-Fällen gegenüber zeigte sich ebenfalls ein statistisch hoch signifi-

kanter Zusammenhang (CIN-Status (%Zellen CEPs>4x%NG)\*MS-Status APC-d5s346, p=0,001).

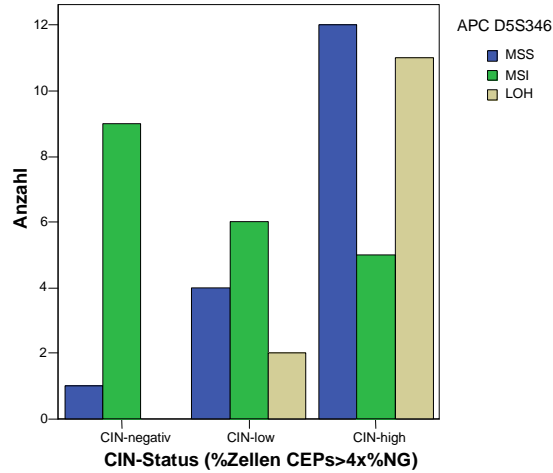


Abb.24: Korrelation zwischen CIN-Status und dem MS-Status von APC-d5s346, p=0,001

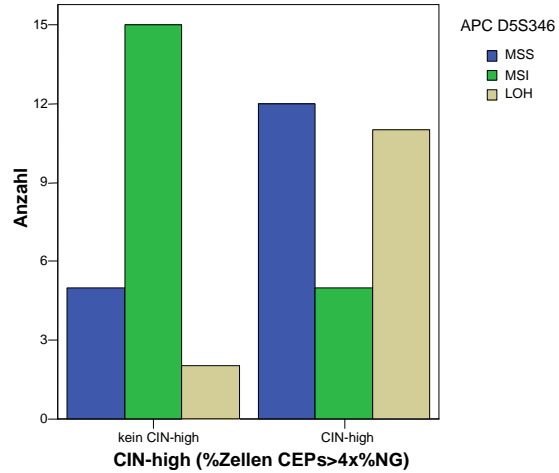


Abb.25: Korrelation zwischen high-CIN-Tu und dem MS-Status von APC-d5s346, p=0,001

### 3.4.2.3 APC-d5s1720

Ergebnisse zur Mikrosatellitenanalyse dieses Markers lagen in 47 von 50 Fällen vor. „CIN-high“-Tumoren schienen positiv mit einem LOH auf APC-d5s1720 zu korrelieren. Dieser Zusammenhang wurde statistisch nicht signifikant.

### 3.4.2.4 d2s123

„CIN-high“-Tumoren zeigten überwiegend eine Stabilität auf d2s123 (MSS), während „CIN-negative“-Tumoren eine Instabilität aufwiesen (MSI). Für die Definition „CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)“ wurde dieser Zusammenhang statistisch signifikant (p=0,028).

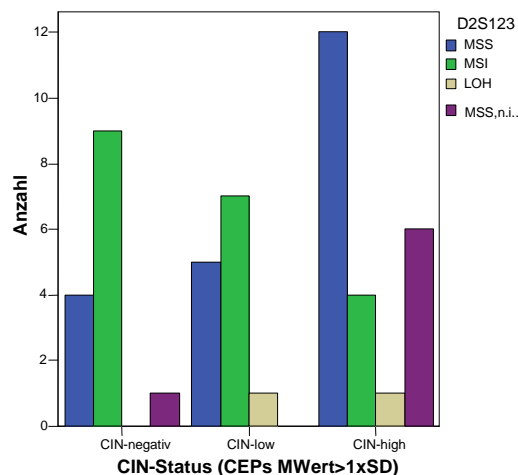


Abb.26: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status des Markers d2s123, p=0,028

### 3.4.2.5 d18s61

Der MS-Status auf d18s61 war bei 49 von 50 Karzinomen bekannt. „CIN-high“-Tumoren hatten signifikant häufiger einen LOH auf d18s61 als Karzinome ohne oder mit nur geringer chromosomaler Instabilität (CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status d18s61,  $p=0,001$ ; CIN-Status (%Zellen CEPs>4x%NG)\*MS-Status d18s61,  $p=0,008$ ; CIN-high (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status d18s61,  $p=0,000$ ; CIN-high (%Zellen CEPs>4x%NG)\*MS-Status d18s61,  $p=0,001$ ).

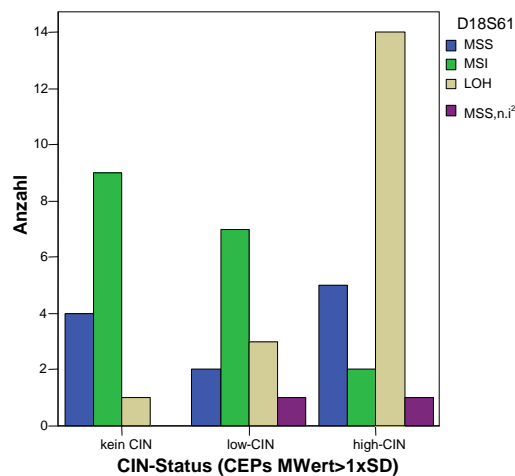


Abb.27: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status des Markers d18s61,  $p=0,001$

### 3.4.2.6 mfd15

Bei 43 von 50 Patienten lagen Ergebnisse zum MS-Status von mfd15 vor. Der Zusammenhang zwischen „CIN-high“-Tumoren und MSS auf mfd15 wurde für „CIN-high (CEPsMWert>1xSD)“ mit  $p=0,037$  statistisch signifikant.

### 3.4.2.7 TP53

Für TP53 (MS-Daten bei 42 von 50 Fällen) ergaben sich weder Trends noch zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen MS-Status und CIN-Status.

### 3.4.2.8 d18s58

Bei 45 von 50 Fällen war der MS-Status auf d18s58 bekannt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-high“-Tumoren und einem LOH auf d18s58 (CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status d18s58,  $p=0,038$ ; CIN-high (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status d18s58,  $p=0,014$ ).

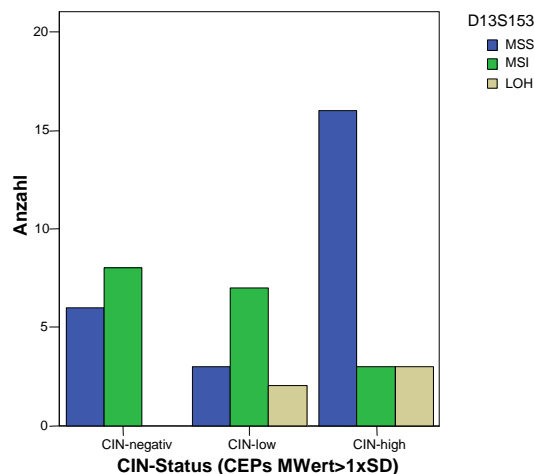


### **3.4.2.9 d10s197**

Da der Marker d10s197 bei der Interpretation überwiegend nicht informativ war, konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich MS-Status und CIN-Status ermittelt werden (MS-Daten bei 41 von 50 Fällen).

### **3.4.2.10 d13s153**

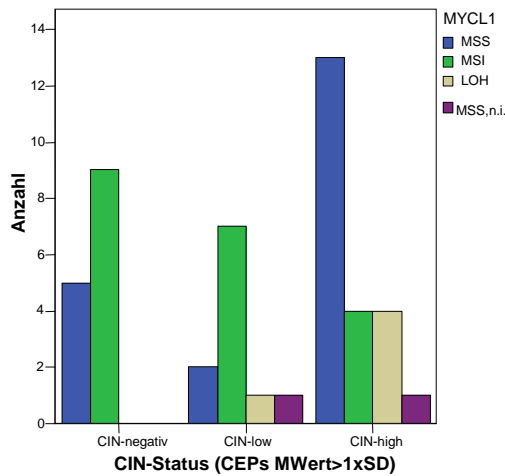
Ergebnisse zur Mikrosatellitenanalyse dieses Markers lagen in 48 von 50 Fällen vor. „CIN-high“-Tumoren korrelierten positiv mit einer Mikrosatellitenstabilität (MSS) auf d13s153. Chromosomal stabile Karzinome („CIN-negativ“) zeigten dagegen vorwiegend eine MSI dieses Markers. „CIN-low“-Tumoren lagen als Übergangsgruppe von der Verteilung der MSS- bzw. MSI-Fälle etwa dazwischen (CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status d13s153,  $p=0,008$ ).



**Abb.28: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status des Markers d13s153,  $p=0,008$**

### **3.4.2.11 mycl1**

Für den Marker mycl1 ergaben sich identische Zusammenhänge wie für d13s153 (bei 47 von 50 Fällen war der MS-Status bekannt) (CIN-Status (CEPsMWert>1xSD)\*MS-Status mycl1,  $p=0,018$ ).

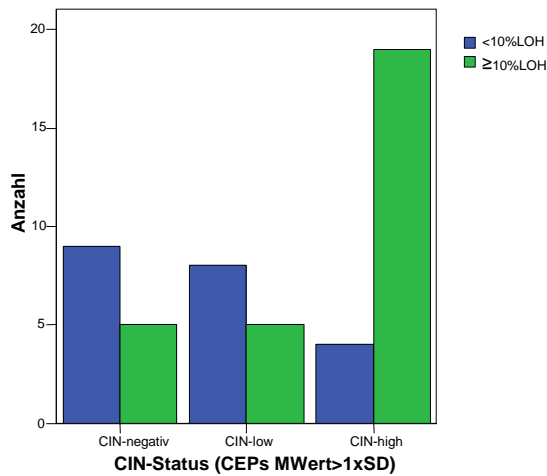


**Abb.29: Korrelation zwischen CIN-Status und MS-Status des Markers mycl1,  $p=0,018$**

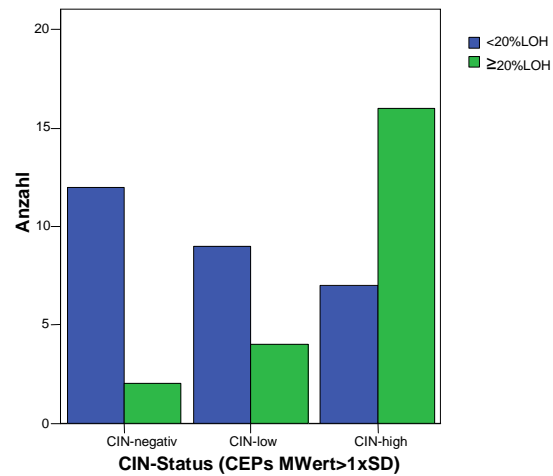
### **3.4.3 CIN und LOH der MS-Marker**

Ein weiterer Punkt mit dem der CIN-Status korreliert wurde, war die Häufigkeit von LOHs auf den Mikrosatellitenmarkern. Dazu wurden alle oben genannten Marker insgesamt betrachtet und für jeden Tumor wurde bestimmt, wie viel Prozent der Marker LOHs zeigten. Es wurden vier Gruppen unterschieden: Tumoren mit mehr als 10% LOHs, mit mehr als 20% LOHs, mit mehr als 30% LOHs und mit mehr als 40% LOHs.

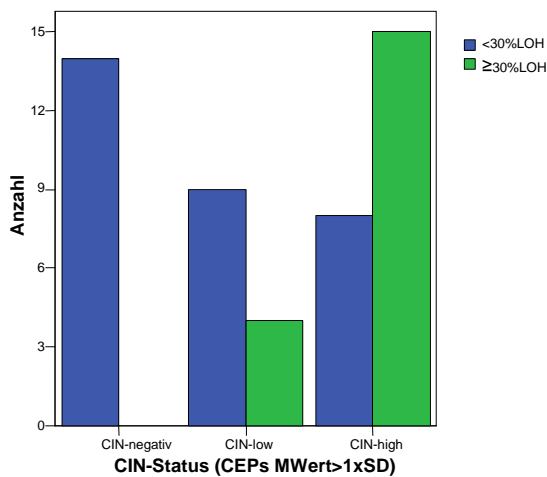
Für jede der genannten Gruppen ergab sich ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen positiven LOH-Event und „CIN-high“-Karzinomen. Tumoren ohne chromosomale Instabilität zeigten häufiger keine LOHs und „CIN-low“-Karzinome stellten sich als Übergangsgruppe dar. Es ergab sich diesbezüglich aber kein Unterschied zwischen den vier Gruppen mit der verschiedenen prozentualen Verteilung. Es verringerte sich lediglich die Anzahl an Tumoren insgesamt, die einen LOH aufwiesen, wenn man von 10% in Richtung 40% ging. Dies hatte wiederum zur Folge, dass, wenn man mit der Bedingung „40% LOHs ja oder nein“ korrelierte, auch die „CIN-high“-Karzinome überwiegend unter 40% LOHs zeigten. Folgende Abbildungen (Abb. 30-33) sollen einen Überblick geben. Die Ergebnisse für die CIN-Definition „CIN-Status (%Zellen CEPs > 4x%NG)\*LOH“ zeigten ebenso hochsignifikante Zusammenhänge ( $p=0,002$  für  $\geq 10\%$  LOH,  $p=0,004$  für  $\geq 20\%$  LOH,  $p=0,000$  für  $\geq 30\%$  LOH und  $p=0,016$  für  $\geq 40\%$  LOH).



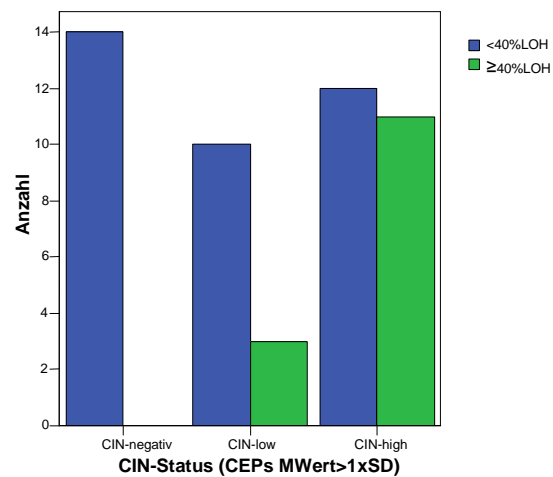
**Abb.30: Korrelation zwischen CIN-Status und LOH bei mehr als 10% der MS-Marker,  $p=0,004$**



**Abb. 31: Korrelation zwischen CIN-Status und LOH bei mehr als 20% der MS-Marker,  $p=0,002$**



**Abb.32: Korrelation zwischen CIN-Status und LOH bei mehr als 30% der MS-Marker,  $p=0,000$**



**Abb. 33: Korrelation zwischen CIN-Status und LOH bei mehr als 40% der MS-Marker,  $p=0,003$**

### 3.4.4 CIN und Methylierung

Es wurde nach einem Zusammenhang zwischen einer p14-, p15-, p16-, und MLH1-Methylierung und dem „CIN-Status“ gesucht. Von den 50 mit FISH analysierten Karzinomen waren allerdings nur 36 diesbezüglich untersucht worden. Dennoch ließ sich eine Tendenz feststellen, dass chromosomal instabile Tumoren häufiger keine Methylierung zeigten. Bei p15 und MLH1 wurde dieser Zusammenhang statistisch signifikant (CIN-negativ (%Zellen CEPs > 4x%NG)\*p15-Methylierung,  $p=0,040$ ; CIN-Status (%Zellen CEPs > 4x%NG)\*p15-Methylierung,  $p=0,054$ ; CIN-high (CEPs MWert > 1xSD)\*MLH1-Metylierung,  $p=0,020$ ; CIN-Status (CEPs MWert > 1xSD)\*MLH1-Metylierung,  $p=0,029$ ).

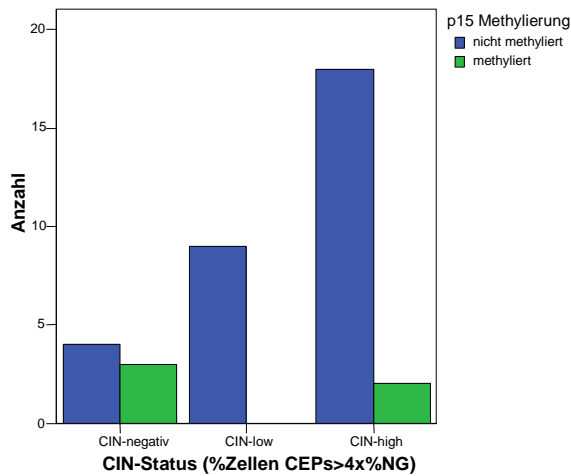


Abb.34: Korrelation zwischen CIN-Status und Methylierung von p15;  $p=0,054$

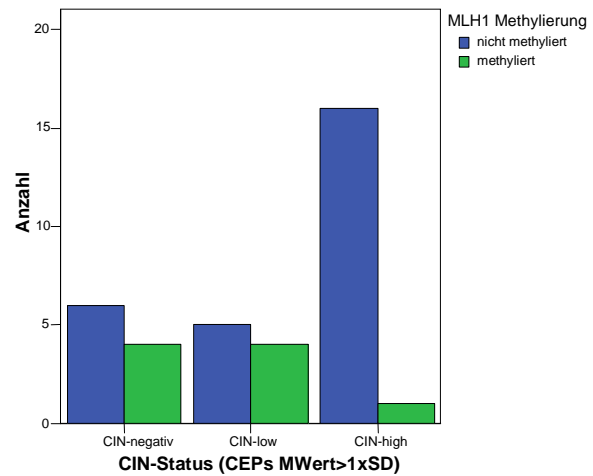


Abb.35: Korrelation zwischen CIN-Status und Methylierung von MLH1;  $p=0,029$

### 3.4.5 CIN und Immunhistochemie von MLH1, MSH2 und MSH6

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung lagen bei je 44 von 50 Fällen bei MLH1 und MSH6 und bei 45 von 50 Fällen bei MSH2 vor. Statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen „CIN-Status“ und Immunhistochemie ergaben sich nur für MLH1 (CIN-Status (CEPsMWert > 1xSD)\*MLH1-IH,  $p=0,003$ ; CIN-Status (%Zellen CEPs > 4x%NG)\*MLH1-IH,  $p=0,012$ ). „CIN-high“-Tumoren waren überwiegend „IH-positiv“, Tumoren ohne chromosomale Instabilität „IH-negativ“ und „CIN-low“-Tumoren nahmen eine Mittelstellung ein.

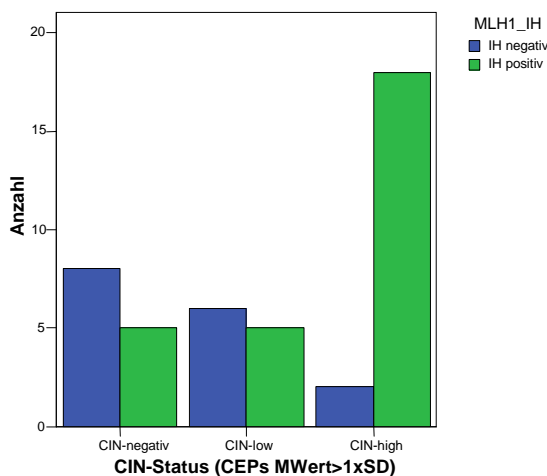


Abb.36: Korrelation zwischen CIN-Status und IH von MLH1,  $p=0,003$

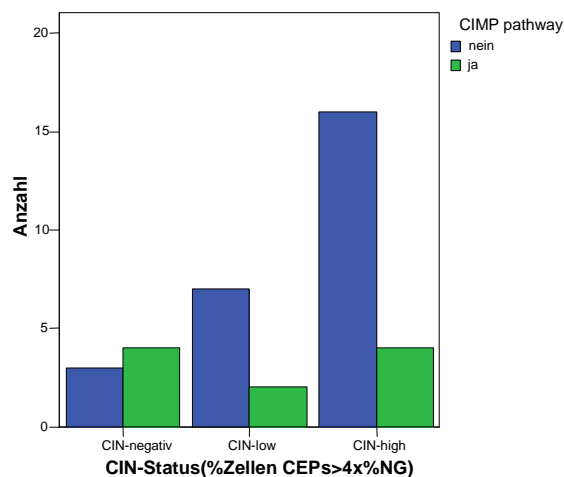
Die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 zeigten in beinahe allen Fällen eine positive immunhistochemische Expression (43 von 45 bzw. 40 von 44 Fällen). Statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem „CIN-Status“ fanden sich nicht.

### **3.4.6 CIN und Maspin**

Die immunhistochemische Expression von Maspin im Zellkern wurde ebenfalls mit dem CIN-Status korreliert. Als „Maspin-positiv“ galten Tumoren mit einer deutlichen immunhistochemischen Färbung in mindestens 10% der Zellen. Daten standen bei 39 von 50 der Fälle zur Verfügung. Insgesamt überwog die Zahl der „Maspin-positiven“-Tumoren deutlich (37 von 39 Fällen). Statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem „CIN-Status“ fanden sich nicht.

### **3.4.7 CIN und CIMP-Pathway**

Ergebnisse bezüglich des CIMP-Pathway lagen bei 36 von 50 Fällen vor. Chromosomal instabile Tumoren waren tendenziell CIMP-negativ, zeigten also keine Methylierung oder maximal eine Methylierung der „CpG islands“ von MLH1. Allerdings wurde dieser Zusammenhang statistisch nicht signifikant.



**Abb.37: Korrelation zwischen CIN-Status und CIMP-pathway,  $p=0,211$**

### **3.4.8 CIN und $\beta$ -catenin**

Die Expression von  $\beta$ -catenin wurde anhand der Ausprägung der Ak-Färbung im Zellkern in vier Gruppen unterteilt: Kernfärbungen von 1%, 2%,  $\geq 10\%$  und  $>70\%$  wurden unterschieden. Ergebnisse lagen von 34 von 50 Karzinomen vor und wurden ebenfalls mit dem CIN-Status

korreliert. Bei einer  $\beta$ cat-Expression im Kern von 1% und  $\geq 10\%$  ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-high“ und positiver  $\beta$ -catenin-Expression (CIN-Status (CEPsMWert $>1$ xSD)\* $\beta$ cat Kern 1%,  $p=0,010$ ; CIN-Status (CEPsMWert $>1$ xSD)\*  $\beta$ cat Kern  $\geq 10\%$ ,  $p=0,000$ ).

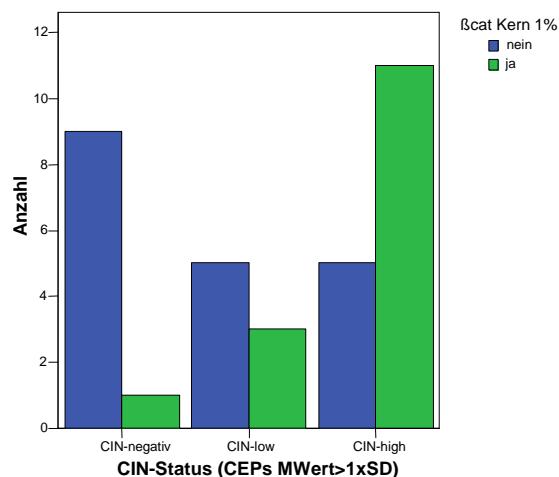


Abb.38: Korrelation zwischen CIN-Status und  $\beta$ -cat-Expr. von 1%,  $p=0,010$

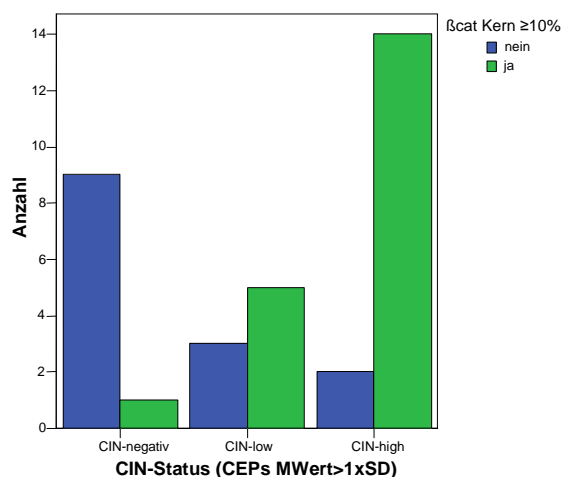


Abb.39: Korrelation zwischen CIN-Status und  $\beta$ -cat-Expr. von  $\geq 10\%$ ,  $p=0,000$

Zur Übersicht über die Punkte 3.4.4 bis 3.4.8 finden sich die Übersichtstabellen Tab.26 und 27 im Anhang.

### 3.5 CIN und p16(9p21)

Wie unter 3.2.1 bereits angeführt, wurde der Marker p16(9p21), der einem Tumorsuppressorgen entspricht, in der FISH-Analyse nicht bzgl. einer chromosomalen Instabilität bewertet, sondern bezüglich des Vorhandenseins eines „LOH-Events“ (vgl. Def. unter 3.2.2).

#### 3.5.1 CIN und p16(9p21)-LOH

Es ergab sich ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein eines „LOH-Events“ und „CIN-high“-Tumoren (CIN-Status (CEPsMWert $>1$ xSD)\*9p21-LOH,  $p=0,002$ ; CIN-Status (%Zellen CEPs $>4$ x%NG)\*9p21-LOH,  $p=0,038$ ).

Tab.28: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu p16(9p21)-LOH <sup>2</sup>									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
LOH	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,002
ja	35	70,00%	9	18,00%	5	10,00%	21	42,00%	
nein	15	30,00%	5	10,00%	8	16,00%	2	4,00%	

<sup>1</sup>CIN-Status(CEPsMWert $>1$ xSD); <sup>2</sup>LOH-Event positiv, wenn %Zellen mit LOH im TU $>4$ x%Zellen mit LOH im NG

Tab.29: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu p16(9p21)-LOH <sup>2</sup>									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
LOH	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,038
ja	35	70,00%	7	14,00%	5	10,00%	23	46,00%	
nein	15	30,00%	3	6,00%	7	14,00%	5	10,00%	

<sup>1</sup>CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG); <sup>2</sup>LOH-Event positiv, wenn %Zellen mit LOH im TU>4x%Zellen mit LOH im NG

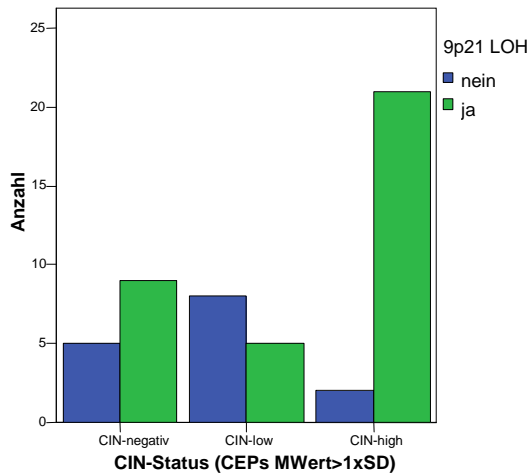


Abb.40: Korrelation zwischen CIN-Status und 9p21-LOH; p=0,002

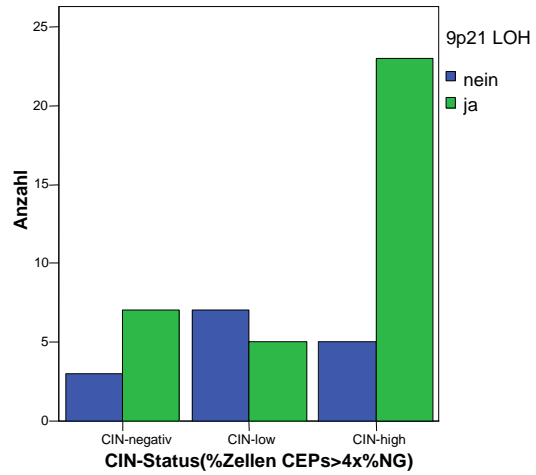


Abb.41: Korrelation zwischen CIN-Status und 9p21-LOH; p=0,038

„CIN-low“-Tumoren zeigten im Vergleich zu „CIN-negativen“- und „CIN-high“- Tumoren wesentlich seltener einen „LOH-Event“ (CIN-low (CEPsMWert>1xSD)\*9p21-LOH, p=0,011; CIN-low (%Zellen CEPs>4x%NG)\*9p21-LOH, p=0,027).

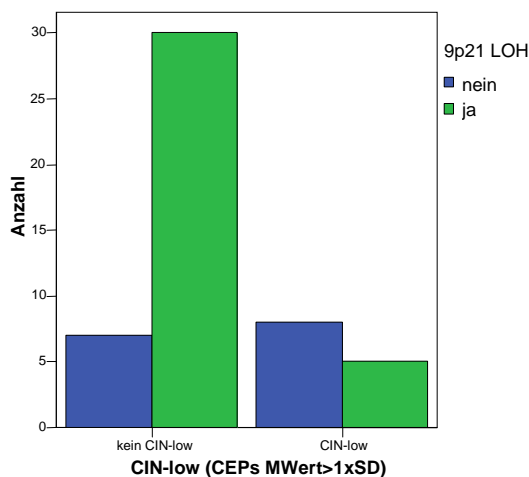


Abb.42: Korrelation zwischen CIN-low-Tu und 9p21-LOH, p=0,011

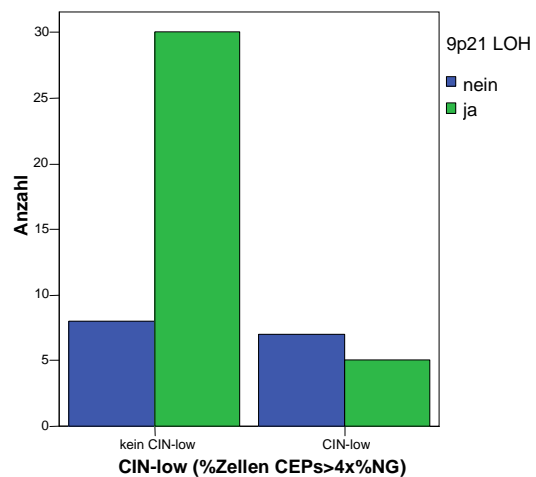


Abb.43: Korrelation zwischen CIN-low-Tu und 9p21-LOH, p=0,027

### 3.5.2 CIN und homozygote p16(9p21)-Deletion

Für den CIN-Status und eine homozygote p16(9p21)-Deletion ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Def. vgl.3.2.2).

### 3.6 CIN und einzelne Centromermarker (CEP3, CEP7, CEP17, 9p21)

Der „CIN-Status“, das heißt ob ein Tumor keine chromosomale Instabilität („CIN-negativ“) zeigt, nur eine geringgradige Instabilität („CIN-low“) aufweist oder chromosomal hoch instabil („CIN-high“) ist, wurde aus der chromosomalen Instabilität der Einzelmarker bestimmt (siehe Definition der CIN). Dennoch war es interessant, den so ermittelten „CIN-Status“ noch einmal in Bezug zu den Alterationen auf den verschiedenen Centromeren sowie dem Locus 9p21 zu setzen.

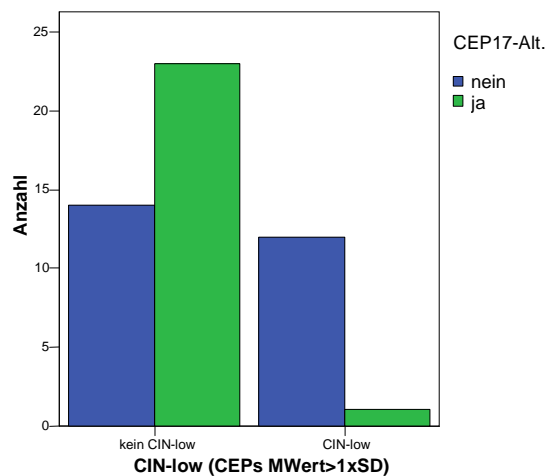
Folgende Tabellen Tab.30 und 31 geben eine Übersicht für die zwei verwendeten CIN-Definitionen:

Tab.30: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu den einzelnen Centromermarkern <sup>2</sup>									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
CEP3-Alteration	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
ja	27	54,00%	0	0,00%	5	10,00%	22	44,00%	
nein	23	46,00%	14	28,00%	8	16,00%	1	2,00%	
CEP7-Alteration	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
ja	29	58,00%	0	0,00%	7	14,00%	22	44,00%	
nein	21	42,00%	14	28,00%	6	12,00%	1	2,00%	
CEP17-Alteration	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
ja	24	48,00%	0	0,00%	1	2,00%	23	46,00%	
nein	26	52,00%	14	28,00%	12	24,00%	0	0,00%	
9p21-Alteration	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
ja	14	28,00%	1	2,00%	0	0,00%	13	26,00%	
nein	36	72,00%	13	26,00%	13	26,00%	10	20,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPsMWert>1xSD); <sup>2</sup> Centromermarker(MWert>1xSD)									

Tab.31: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu den einzelnen Centromermarkern <sup>2</sup>									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
CEP3-Alteration	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
ja	26	52,00%	0	0,00%	3	6,00%	23	46,00%	
nein	24	48,00%	10	20,00%	9	18,00%	5	10,00%	
CEP7-Alteration	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
ja	32	64,00%	0	0,00%	5	10,00%	27	54,00%	
nein	18	36,00%	10	20,00%	7	14,00%	1	2,00%	
CEP17-Alteration	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
ja	31	62,00%	0	0,00%	4	8,00%	27	54,00%	
nein	19	38,00%	10	20,00%	8	16,00%	1	2,00%	
9p21-Alteration <sup>3</sup>	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,002
ja	14	28,00%	1	2,00%	0	0,00%	13	26,00%	
nein	36	72,00%	9	18,00%	12	24,00%	15	30,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG); <sup>2</sup> Centromermarker(%Zellen>4x%NG); <sup>3</sup> 9p21MWert>1xSD									



Interessant waren vor allem die Alterationen der einzelnen Centromeren bei den „CIN-low“-Karzinomen. Bei der CIN-Definition „CEPs MWert>1xSD“ wurde dieser Zusammenhang besonders deutlich (vgl. Tab. 30): Während sich bei CEP3 und CEP7 Fälle mit und ohne Alteration beinahe die Waage hielten (CEP3: 8 nicht alteriert, 5 alteriert; CEP7 6 nicht alteriert, 7 alteriert) zeigte sich bei CEP17 ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-low“-Karzinomen und fehlender CEP17-Alteration (CEP17: 12 nicht alteriert, 1 alteriert; CIN-low(CEPsMWert>1xSD)\*CEP17 MWert >1xSD,  $p=0,001$ ).



**Abb.44: Korrelation zwischen CIN-low-Tumoren und einer Alteration auf CEP17,  $p=0,001$**

### **3.7 Korrelationen der einzelnen Centromermarker**

Alle Centromer-Einzelmarker wurden mit den gleichen Parametern korreliert wie der „CIN-Status“. Von den Ergebnissen werden der Übersicht halber, und weil der „CIN-Status“ ohnehin aus den Einzelmarkern ermittelt wurde und positiv damit korreliert (siehe oben), nur die wichtigsten dargestellt. Die Ergebnisse, einschließlich der p-Werte, sind in den Übersichtstabellen Tab. 32 bis Tab. 37 im Anhang aufgelistet.

#### **3.7.1 CEP3**

##### **3.7.1.1 CEP3 und MS-Status**

Die Mehrzahl der CEP3-Alterationen kam bei MSS-Tumoren (20 von 27=74,07% bzw. 20 von 26=76,92%) vor und die Karzinome mit einem stabilen CEP3 waren vorwiegend MSI-Tumoren (15 von 23=65,22% bzw. 16 von 24=66,66%). 28,57% der (8 von 28) MSS-Fälle zeigten jedoch keine CEP3-Alteration und 31,82% (7 von 22) bzw. 27,27% (6 von 22) der MSI-Fälle waren auf CEP3 alteriert. Unterschied man noch zusätzlich MSI-high und MSI-low-Tumoren zeigten sich wie, auch beim CIN-Status, hoch signifikante Zusammenhänge

zwischen einer CEP3-Alteration und MSS-Tumoren bzw. dem Fehlen einer CEP3-Alteration und MSI-high-Tumoren. Die Mehrzahl der MSI-low-Tumoren zeigte eine Alteration auf CEP3 (je 6 von 9=66,66%) (vgl. Übersichtstabellen Tab.32/33 im Anhang).

### **3.7.1.2 CEP3 und p16(9p21)-LOH**

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich zwischen einer vorhandenen CEP3-Alteration und einem p16(9p21)-LOH.

### **3.7.1.3 CEP3 und MS-Einzelmarker**

Statistisch signifikante Ergebnisse zeigten sich bei: BAT25, BAT26 und BAT40 sowie APC-d5s346, d18s61 (CEP3-Alteration/d18s61-LOH) und mycl1. Die Zusammenhänge waren identisch zum CIN-Status insgesamt (vgl. Übersichtstabellen Tab.32/33 im Anhang).

Außerdem korrelierte eine vorhandene CEP3-Alteration positiv mit LOHs bei den MS-Einzelmarkern, ebenfalls in identischer Weise wie beim CIN-Status beschrieben.

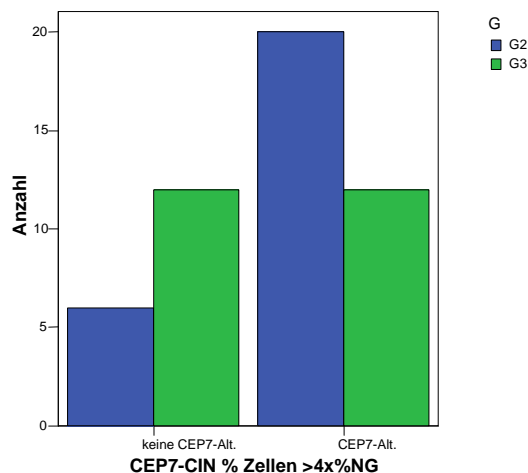
### **3.7.1.4 CEP3 und $\beta$ -catenin**

Bei einer  $\beta$ cat-Expression im Kern von 1% und  $\geq 10\%$  ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen vorhandener CEP3-Alteration und positiver  $\beta$ -catenin-Expression.

## **3.7.2 CEP7**

### **3.7.2.1 CEP7 und Grading**

Karzinome mit vorhandener CEP7-Alteration wiesen einen höheren Differenzierungsgrad auf als solche ohne CEP7-Alteration. Dieser Trend war bei CEP7 viel deutlicher zu erkennen als bei den anderen Centromer-Markern, wurde aber nicht statistisch signifikant.



**Abb.45: Korrelation zwischen CEP7-Alteration und Grading,  $p=0,077$**

### 3.7.2.2 CEP7 und MS-Status

Die Mehrzahl der CEP7-Alterationen kam bei MSS-Tumoren vor (23 von 29=79,31% bzw. 24 von 32=75%) und die Karzinome mit einem stabilen CEP7 waren vorwiegend MSI-Tumoren (16 von 21=76,19% bzw. 14 von 18=77,77%). 17,86% (5 von 28) bzw. 14,29% (4 von 28) der MSS-Fälle zeigten jedoch keine CEP7-Alteration und 27,27% (6 von 22) bzw. 36,36% (8 von 22) MSI-Fällen waren auf CEP7 alteriert. Unterschied man wieder zusätzlich MSI-low- und MSI-high-Fälle, so zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen einer CEP7-Alteration und MSS-Tumoren sowie zwischen einer fehlenden CEP7-Alteration und MSI-high-Tumoren. Alle MSI-low-Tumoren hatten eine Alteration auf CEP7 (vgl. Übersichtstabellen Tab. 34/35 im Anhang). Insgesamt betrachtet verhielt sich CEP7 eher dem MS-Status entsprechend als CEP3.

### 3.7.2.3 CEP7 und MS-Einzelmarker

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich bei: BAT25, BAT26 und BAT40 sowie APC-d5s346, d2s123, d18s61 (CEP7-Alteration/d18s61-LOH), mfd15, d18s58 (CEP7-Alteration/d18s58-LOH), d13s153 und mycl1.

Außerdem korrelierte eine vorhandene CEP7-Alteration positiv mit LOHs bei den MS-Einzelmarkern.

Insgesamt betrachtet korrelierte CEP7 besser mit dem MS-Status wie CEP3 und ergab bei deutlich mehr Markern statistisch signifikante Ergebnisse.

### 3.7.2.4 CEP7 und MLH1

Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich zwischen einer vorhandenen CEP7-Alteration und einer fehlenden Methylierung sowie einer positiven Immunhistochemie von MLH1.

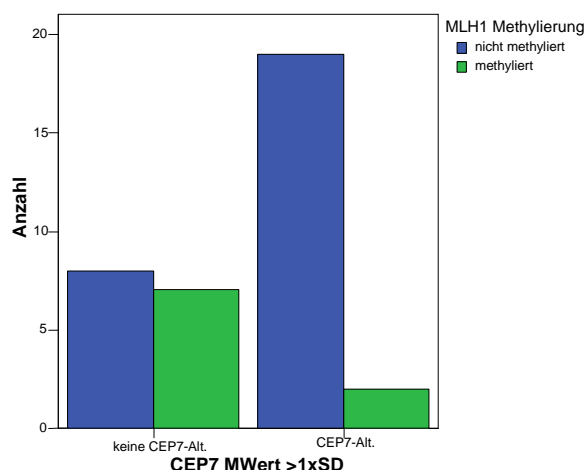


Abb.46: Korrelation zwischen CEP7-Alteration und MLH1-Methylierung,  $p=0,019$

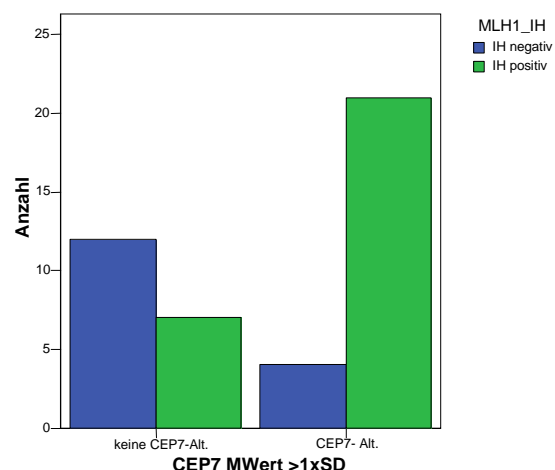


Abb.47: Korrelation zwischen CEP7-Alteration und MLH1-IH,  $p=0,002$

### **3.7.2.5 CEP7 und $\beta$ -catenin**

Bei einer  $\beta$ cat-Expression im Kern von 1% und  $\geq 10\%$  ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen vorhandener CEP7-Alteration und positiver  $\beta$ -catenin-Expression.

### **3.7.3 CEP17**

#### **3.7.3.1 CEP17 und Tumorlokalisation**

Bei vorhandener CEP17-Alteration zeigte sich ein Überwiegen der linksseitig lokalisierten Karzinome, während bei fehlender CEP17-Alteration eher rechtsseitig lokalisierte Tumoren überwogen. Diese Zusammenhänge wurden statistisch nicht signifikant.

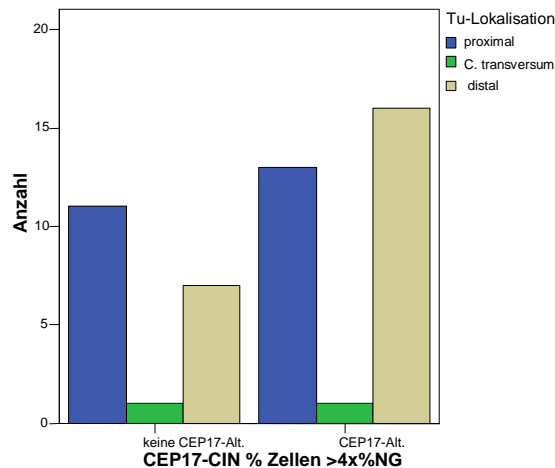


Abb.48: Korrelation zwischen CEP17-Alteration und Tu-Lokalisation,  $p=0,531$

#### **3.7.3.2 CEP17 und Grading**

Es zeigte sich der Trend, dass Karzinome mit vorhandener CEP17-Alteration einen höheren Differenzierungsgrad aufwiesen als solche ohne CEP17-Alteration, dies wurde jedoch nicht statistisch signifikant und war auch nicht ganz so deutlich wie bei CEP7.

#### **3.7.3.3 CEP17 und MS-Status**

Die Mehrzahl der CEP17-Alterationen kam bei MSS-Tumoren (20 von 24=83,33% bzw. 24 von 31=77,42%) vor und die Karzinome ohne CEP17-Alteration waren vorwiegend MSI-Tumoren (18 von 26=69,23% bzw. 15 von 19=78,95%). 28,57% (8 von 28) bzw. 14,29% (4 von 28) der MSS-Fälle zeigten jedoch keine CEP17-Alteration und 18,18% (4 von 22) bzw. 31,82% (7 von 22) der MSI-Fälle waren auf CEP17 alteriert. Wurde noch zusätzlich zwischen MSI-low- und MSI-high-Fällen unterschieden, so zeigte sich wie auch bei CEP3 und CEP7 ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang zwischen einer CEP17-Alteration und MSS-Tumoren sowie zwischen einer fehlenden CEP17-Alteration und MSI-high-Tumoren. Die

MSI-low-Tumoren hatten überwiegend eine Alteration auf CEP17 (je 7 von 9=77,77%; vgl. Übersichtstabellen Tab.36/37 im Anhang). Insgesamt betrachtet verhielt sich CEP17 eher dem MS-Status entsprechend als CEP3 und etwa gleich wie CEP7.

#### **3.7.3.4 CEP17 und p16-LOH**

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich zwischen einer vorhandenen CEP17-Alteration und einem p16-LOH. Dieser Zusammenhang wurde weniger deutlich als zwischen einer CEP3-Alteration und einem p16-LOH.

#### **3.7.3.5 CEP17 und MS-Einzelmarker**

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich bei: BAT25, BAT26 und BAT40 sowie APC-d5s346, APC-d5s1720 (CEP17-Alteration/APC-d5s1720-LOH), d2s123, d18s61 (CEP17-Alteration/d18s61-LOH), d18s58 (CEP17-Alteration/d18s58-LOH), d13s153 und mycl1.

Außerdem korrelierte eine vorhandene CEP17-Alteration positiv mit LOHs bei den MS-Einzelmarkern.

Insgesamt betrachtet korrelierte CEP17 besser mit dem MS-Status wie CEP3 und ergab bei deutlich mehr Markern statistisch signifikante Ergebnisse, vergleichbare Ergebnisse lieferte CEP7.

#### **3.7.3.6 CEP17 und MLH1**

Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich zwischen einer vorhandenen CEP17-Alteration und einer fehlenden Methylierung sowie einer positiven Immunhistochemie von MLH1.

#### **3.7.3.7 CEP17 und $\beta$ -catenin**

Bei einer  $\beta$ cat-Expression im Kern von 1% und  $\geq 10\%$  ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen vorhandener CEP17-Alteration und positiver  $\beta$ -catenin-Expression im Kern.

#### **3.7.4 p16(9p21)**

Der Marker p16(9p21) war in Hinsicht auf vorhandene Alterationen vor allem in Bezug auf „LOH-Events“ interessant. Dennoch soll kurz aufgezeigt werden, welche Ergebnisse die Korrelation einer p16(9p21)-Alteration ergaben. Bei der Definition „p16(9p21)MWert $>1 \times SD$ “, wo der Mittelwert im Tumor außerhalb des Bereiches Mittelwert im Normalgewebe  $\pm$  der einfachen Standardabweichung liegen musste, damit eine Alteration vorlag, lag nur bei 28% (14 von 50) der Karzinome eine 9p12-Alteration, so dass die Verteilung für das Erreichen statistisch signifikanter Ergebnisse eher ungünstig war. Die Übersichtstabelle Tab.38 für die p16(9p21)-Korrelationen findet sich ebenfalls im Anhang.

#### **3.7.4.1 p16(9p21) und klinisch-pathologische Parameter**

Es zeigte sich ein Trend, dass Tumoren mit einer 9p21-Alteration eher im distalen Kolon lokalisiert waren und häufiger G2 als G3.

#### **3.7.4.2 p16(9p21) und MS-Status**

Die Mehrzahl der 9p21-Alterationen kam bei MSS-Tumoren (12 von 14; 85,71%) vor, die Karzinome mit einem stabilen 9p21 waren aber nur in 55,55% MSI-Tumoren (20 von 36). 57,14% (16 von 28) der MSS-Fälle zeigten keine 9p21-Alteration und 9,09% (2 von 22) MSI-Fällen waren auf 9p21 alteriert. Das Problem war also, dass mit dieser Definition, ohne Berücksichtigung von LOHs, eine Vielzahl von MSS-Tumoren fälschlicherweise als chromosomal stabil bezeichnet wurde. Statistisch signifikante Ergebnisse zeigten sich auch, wenn zusätzlich MSI-high und MSI-low-Tumoren unterschieden wurden, wobei sich letztere nahezu gleich auf die Gruppen mit und ohne p16(9p21)-Alteration verteilten.

#### **3.7.4.3 p16(9p21) und p16(9p21)-LOH**

Sowohl bei der Gruppe mit als auch bei der ohne p16(9p21)-Alteration zeigte die Mehrzahl einen p16(9p21)-LOH. Trotzdem ergab sich ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen Alteration und LOH, da in der alterierten Gruppe kein einziger Fall ohne LOH vorkam.

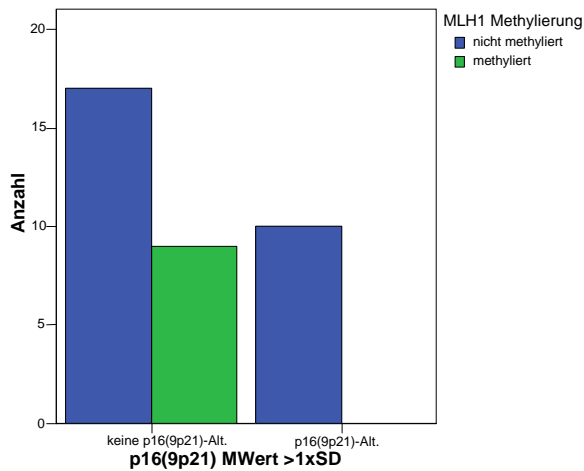
#### **3.7.4.4 p16(9p21) und MS-Einzelmarker**

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich bei: BAT25, BAT26 und BAT40 sowie APC-d5s346 und d18s61 (9p21-Alteration/d18s61-LOH).

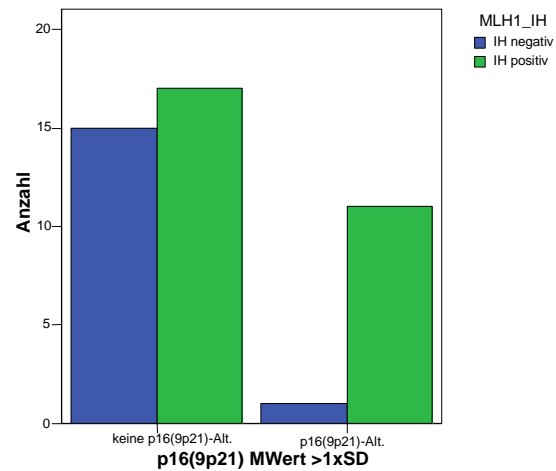
Außerdem korrelierte eine vorhandene 9p21-Alteration positiv mit LOHs der MS-Einzelmarkern.

#### **3.7.4.5 p16(9p21) und MLH1**

Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich zwischen einer vorhandenen 9p21-Alteration und einer fehlenden Methylierung sowie einer positiven Immunhistochemie von MLH1. Zwar überwogen in beiden Gruppen die nicht methylierten bzw. die IH-positiven Fälle, aber bei keinem einzigen Tumor mit einer 9p21-Alteration war MLH1 methyliert und verhältnismäßig zeigten bei vorhandener 9p21-Alteration mehr Karzinome eine positive Immunhistochemie für MLH1.



**Abb.49: Korrelation zwischen 9p21-Alteration und MLH1-Methylierung,  $p=0,039$**



**Abb.50: Korrelation zwischen 9p21-Alteration und MLH1-IH,  $p=0,032$**

### **3.7.5 p16(9p21)-LOH und klinisch-pathologische Parameter**

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse beschrieben, die nicht bereits an anderer Stelle erwähnt wurden. Zwischen einem 9p21-LOH und dem MS-Status ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang, deshalb wird auch auf die MS-Einzelmarker nicht näher eingegangen. Die Ergebnisse der Korrelation mit dem „CIN-Status“ sind unter 3.5 beschrieben (siehe dort).

Ein 9p21-LOH korrelierte mit einem schlechteren histopathologischen Grading. Während bei Karzinomen ohne 9p21-LOH 66,66% (10 von 15) G2 waren und nur 33,33% (5 von 15) G3, waren bei vorhandenem LOH nur 45,71% (16 von 35) G2 und 54,29% (19 von 35) G3. Dieser Zusammenhang wurde statistisch nicht signifikant.

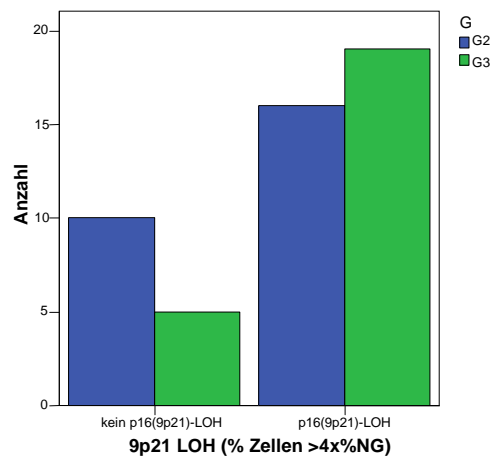


Abb.51: Korrelation zwischen 9p21-LOH und Grading,  $p=0,224$

Desweiteren zeigte sich ein Trend, dass bei Tumoren mit einem 9p21-LOH häufiger Patienten in der Altersgruppe über 60 Jahren betroffen waren, während bei fehlendem LOH knapp die unter 60-jährigen überwogen.

Tab.39: p16(9p21)-LOH <sup>1</sup> in Korrelation zum Patientenalter							
	Tu ges.		p16-LOH		kein p16-LOH		
	n	%	n	%	n	%	p
Alter	50	100,00%	35	70,00%	15	30,00%	0,205
< 60 J	19	38,00%	11	22,00%	8	16,00%	
> 60 J	31	62,00%	24	48,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> LOH-Event positiv, wenn %Zellen mit LOH im TU>4x%Zellen mit LOH im NG							

### 3.7.6 p16(9p21)-homozygote Deletion

Neben dem Anteil an Zellen mit einem 9p21-LOH wurde auch ermittelt wie viele Fälle einen kompletten Verlust von 9p21 zeigten. Auch hier wurde das Normalgewebe als Referenz genommen und eine homozygote 9p21-Deletion lag definitionsgemäß dann vor, wenn der prozentuale Anteil an Zellen mit einer homozygoten Deletion vierfach größer war als im Normalgewebe. Nur sieben von 50 Tumoren, also 14%, wiesen laut dieser Definition eine homozygote 9p21-Definition auf.

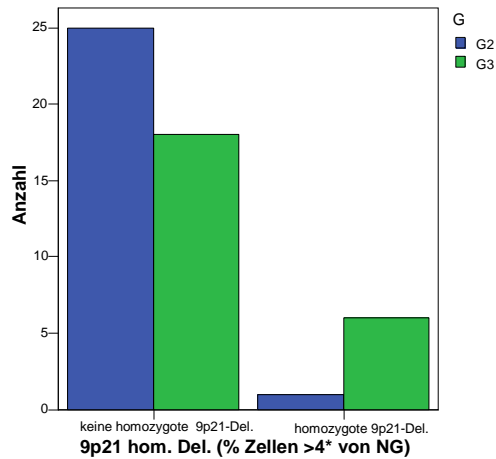
Zwischen einer homozygoten 9p21-Deletion und dem MS-Status ergab sich kein Zusammenhang, deshalb wird auch auf die MS-Einzelmarker nicht eingegangen.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen einer homozygoten 9p21-Deletion und einem schlechtem histopathologischen Grading. Bei vorhandener Deletion hat-



### 3. Ergebnisse \_\_\_\_\_ 3.8 MS-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

ten 6 von 7 Tumoren, also 85,71% ein G3-Grading und nur einer, also 14,29% ein G2-Grading; bei fehlender Deletion dagegen hatten 25 von 43, also 58,14% ein G2-Grading und nur 41,86% (18 von 43) waren G3-Tumoren.



*Abb.52: Korrelation zwischen homozygoter 9p21-Del. und Grading,  $p=0,045$*

Es zeigte sich ein weiterer Trend (statistisch nicht signifikant), dass bei vorhandener homozygoter Deletion, die Zahl der Frauen (5 von 7) und bei fehlender Deletion die Zahl der Männer (27 von 43) überwog.

### **3.8 MS-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern**

Neben der Korrelation des CIN-Status mit allen anderen Variablen, wurde auch der MS-Status allen Parametern gegenübergestellt. Es wurden drei Gruppen von Tumoren unterschieden: MSS, MSI-low und MSI-high. Ein Tumor wurde als MSS bezeichnet wenn auf keinem der 13 Marker eine Mikrosatelliteninstabilität vorlag. Zeigten dagegen genau einer oder zwei Marker eine Mikrosatelliteninstabilität wurde der Tumor als MSI-low klassifiziert. MSI-high setzte eine Mikrosatelliteninstabilität in mehr als 2 der 13 Marker voraus.

### 3. Ergebnisse 3.8 MS-Status in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

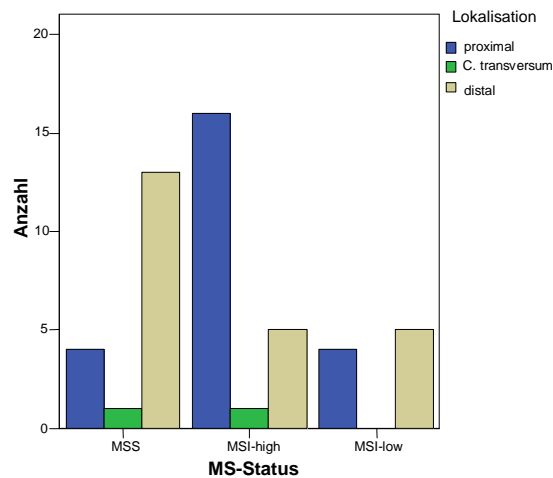
Tab.40: MS-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern									
	Tu ges.		MSS		MSI-low		MSI-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
Tu-Stadium <sup>2</sup>	49	100,00%	18	36,73%	9	18,37%	22	44,90%	0,102
T1	3	6,12%	3	6,12%	0	0,00%	0	0,00%	
T2	9	18,37%	4	8,16%	0	0,00%	5	10,20%	
T3	26	53,06%	6	12,24%	8	16,33%	12	24,49%	
T4	11	22,45%	5	10,20%	1	2,04%	5	10,20%	
N-Status <sup>2</sup>	49	100,00%	18	36,73%	9	18,37%	22	44,90%	0,687
N0	26	53,06%	8	16,33%	5	10,20%	13	26,53%	
N1	9	18,37%	3	6,12%	1	2,04%	5	10,20%	
N2	14	28,57%	7	14,29%	3	6,12%	4	8,16%	
Tu-Lokalisation	49	100,00%	18	36,73%	9	18,37%	22	44,90%	0,009
proximal	24	48,98%	4	8,16%	4	8,16%	16	32,65%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	0	0,00%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	13	26,53%	5	10,20%	5	10,20%	
Grading	50	100,00%	19	38,00%	9	18,00%	22	44,00%	0,035
G2	26	52,00%	12	24,00%	7	14,00%	7	14,00%	
G3	24	48,00%	7	14,00%	2	4,00%	15	30,00%	
Alter	50	100,00%	19	38,00%	9	18,00%	22	44,00%	0,931
< 60 J	19	38,00%	7	14,00%	4	8,00%	8	16,00%	
> 60 J	31	62,00%	12	24,00%	5	10,00%	14	28,00%	
Geschlecht	50	100,00%	19	38,00%	9	18,00%	22	44,00%	0,074
m	29	58,00%	15	30,00%	4	8,00%	10	20,00%	
w	21	42,00%	4	8,00%	5	10,00%	12	24,00%	
Überleben	50	100,00%	19	38,00%	9	18,00%	22	44,00%	0,543
lebt	32	64,00%	11	22,00%	5	10,00%	16	32,00%	
verstorben	18	36,00%	8	16,00%	4	8,00%	6	12,00%	
Überlebensrate	50	100,00%	19	38,00%	9	18,00%	22	44,00%	0,392
>36 Monate	33	66,00%	11	22,00%	5	10,00%	17	34,00%	
<=36 Monate	17	34,00%	8	16,00%	4	8,00%	5	10,00%	
<sup>1</sup> MSS: keine Mikrosatelliteninstabilität (0/13 Markern), MSI-low: Mikrosatelliteninstabilität auf 1/13 oder 2/13 Markern, MSI-high: Mikrosatelliteninstabilität > 2/13 Markern; <sup>2</sup> nach UICC									

#### **3.8.1 MS-Status und Tumorstadium**

Auffällig war, dass T1-Tumoren ausschließlich in der MSS-Gruppe vorkamen. Aufgrund einer zu geringen Anzahl an T1-Tumoren von nur drei insgesamt, ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

#### **3.8.2 MS-Status und Tumorlokalisation**

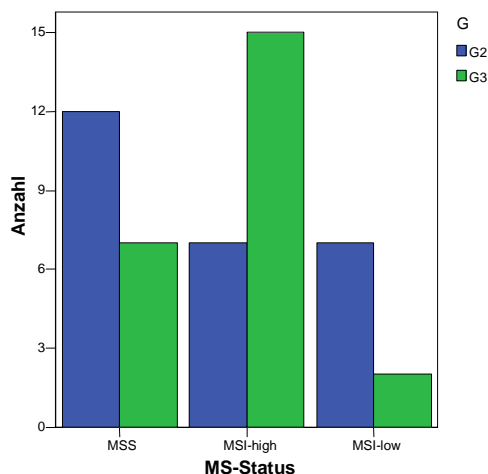
Statistisch signifikante Zusammenhänge fanden sich zwischen der Tumorlokalisation und dem MS-Status. MSS-Tumoren waren zu 72,22% (13 von 18) im distalen Kolon lokalisiert, MSI-high-Tumoren zu 72,73% (16 von 22) im proximalen Kolon. MSI-low-Tumoren waren zu 44,44% im proximalen und zu 55,55% im distalen Kolon lokalisiert. Sie scheinen diesbezüglich eine Art Mittelstellung zwischen MSS und MSI-high einzunehmen.



**Abb.53: Korrelation zwischen MS-Status und Tu-Lokalisation,  $p=0,009$**

### **3.8.3 MS-Status und Differenzierungsgrad**

Ähnlich waren die Verhältnisse beim Differenzierungsgrad. MSS-Tumoren hatten in 63,16% (12 von 19) ein G2-Grading; MSI-high-Tumoren in 68,18% (15 von 22) ein G3-Grading. Die MSI-low-Karzinome stellten sich hier eher auf die Seite der MSS-Tumoren; sie hatten sogar in 77,77% (7 von 9) ein G2-Grading ( $p=0,035$ ).



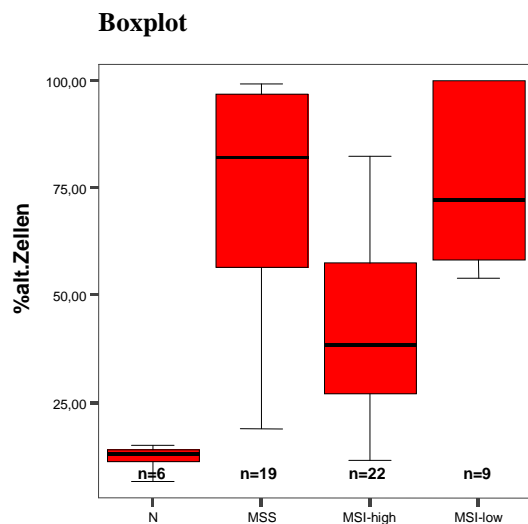
**Abb.54: Korrelation zwischen MS-Status und Grading,  $p=0,035$**

### **3.8.4 MS-Status und Geschlecht**

Bei den MSS-Tumoren war der Anteil der Männer größer (15 von 19), bei den MSI-Tumoren der Anteil der Frauen (12 von 22). Die MSI-low-Fälle zeigten ein knappes Überwiegen des weiblichen Geschlechts (5 von 9). Allerdings waren diese Zusammenhänge statistisch nicht signifikant ( $p=0,074$ ).

## **3.9 MS-Status in Korrelation mit molekularen Markern**

Die Übersichtstabelle Tab. 41 findet sich im Anhang. Folgende Grafik zeigt die Verteilung alterierter Zellen in den drei verschiedenen Tumorgruppen im Vergleich zum Normalgewebe. Bei der MSI-high-Gruppe war der Anteil alterierter Zellen deutlich niedriger als bei der MSS- und MSI-low-Gruppe.



**Abb.55: Vergleich % alt. Zellen in 6 Normalgeweben und 50 Tumorgeweben**

### **3.9.1 MS-Status und CEPs**

CEP3 war bei MSS und MSI-low-Tumoren meist alteriert, während MSI-high-Fälle häufiger keine Alteration auf CEP3 hatten ( $MS\text{-}Status * CEP3MWert > 1xSD$ ,  $p=0,024$ ;  $MS\text{-}Status * CEP3\text{-}CIN\%Zellen > 4x\%NG$ ,  $p=0,008$ ). Die gleiche Verteilung zeigte sich auch bei CEP7 und CEP17, wobei diese noch besser mit dem MS-Status korrelierten als CEP3 ( $MS\text{-}Status * CEP7MWert > 1xSD$ ,  $p=0,000$ ;  $MS\text{-}Status * CEP7\text{-}CIN\%Zellen > 4x\%NG$ ,  $p=0,001$ ;  $MS\text{-}Status * CEP17MWert > 1xSD$ ,  $p=0,001$ ;  $MS\text{-}Status * CEP17\text{-}CIN\%Zellen > 4x\%NG$ ,  $p=0,000$ ).

### 3.9.2 MS-Status und p16(9p21)

Bei 9p21 war insgesamt der Anteil an Fällen ohne Alteration, mit 36 von 50 (72%), sehr groß. Dies resultierte daraus, dass die Deletionen nicht als Alteration betrachtet wurden und durch den verwendeten Mittelwert als Bezugsgröße sogar die Alterationen ausglich.

Nur bei der Gruppe der MSI-low-Fälle überwog die Anzahl der alterierten Tumoren um eins gegenüber den nicht alterierten, während, sowohl bei MSS als auch bei MSI-high mehr Fälle ohne Alteration vorlagen, wobei im Vergleich bei den MSS-Tumoren verhältnismäßig doch mehr alteriert waren, nämlich 36,84% (7 von 19) bei MSS vs. 9,09% (2 von 22) bei MSI-high ( $\text{MS-Status} * 9\text{p}21\text{MWert} > 1 \times \text{SD}$ ,  $p=0,015$ ).

Korrelierte man den MS-Status mit dem Vorhandensein eines 9p21-LOH, so zeigten sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Insgesamt zeigten 35 von 50 Fällen einen LOH und in jeder der drei Gruppen überwogen die LOH-positiven Fälle. Verhältnismäßig zeigten MSS (78,95%=15 von 19) und MSI-low (77,77%=7 von 9) mehr LOHs als MSI-high (59,09%=13 von 22).

### 3.9.3 MS-Status und CIN-Status

Diese Korrelationen wurden unter 3.4.1 bereits beschrieben (vgl. Tab.20-23 und Abb.14-23). An dieser Stelle soll nochmal betont werden, dass MSS- und MSI-low-Tumoren zum Großteil „CIN-high“ waren, während sich MSI-high-Tumoren annähernd gleich auf alle drei CIN-Gruppen verteilten. Folgende Balkendiagramme geben einen Überblick:

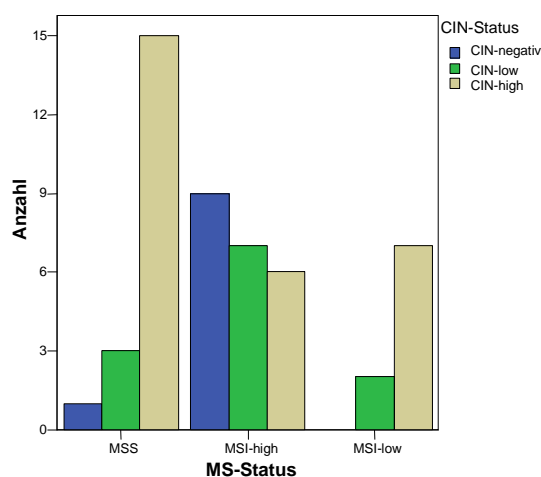


Abb.56: Korrelation zwischen MS-Status und CIN-Status (%ZellenCEPs > 4x%NG),  $p=0,003$

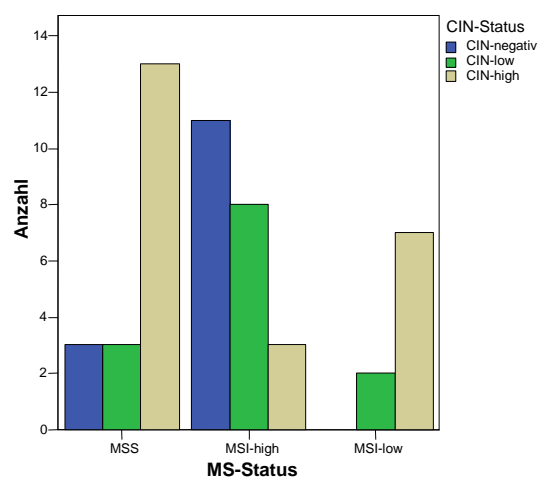
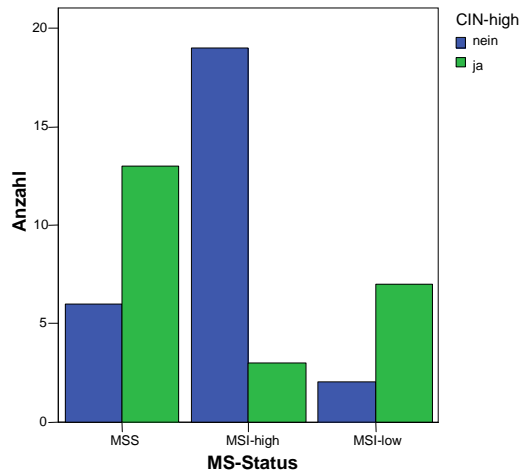


Abb.57: Korrelation zwischen MS-Status und CIN-Status (CEPsMWert > 1xSD),  $p=0,001$

Korrelierte man den MS-Status mit „CIN-high“ und „nicht CIN-high“-Tumoren, so zeigte sich, dass in der MSI-high-Gruppe die „nicht CIN-high“-Tumoren deutlich überwogen, während bei MSS und MSI-low mehr „CIN-high“-Fälle vorkamen.

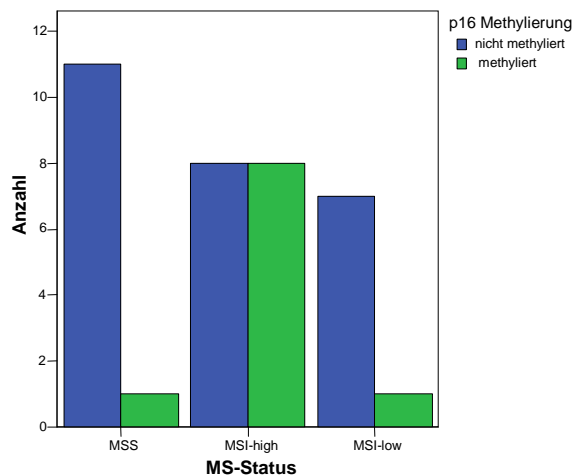


**Abb.58: Korrelation zwischen MS-Status und CIN-high (CEPsMWert>1xSD),  $p=0,000$**

### 3.9.4 MS-Status und Methylierung

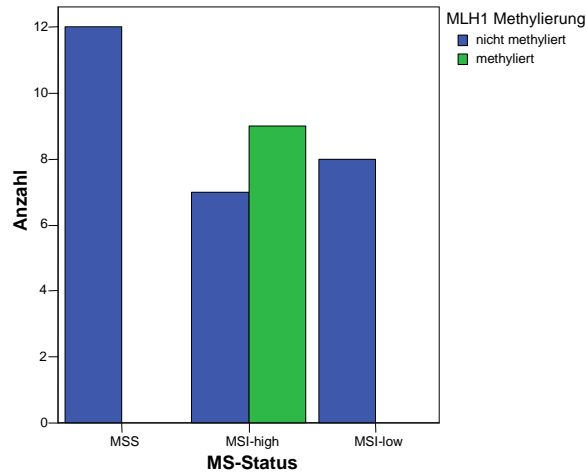
Es wurde nach einem Zusammenhang zwischen einer p14-, p15-, p16-, und MLH1-Methylierung und dem „MS-Status“ gesucht. Daten hierzu lagen bei 36 von 50 Karzinomen vor.

Je gleich viele MSI-high-Tumoren zeigten eine p16-Methylierung bzw. keine p16-Methylierung, bei MSS und MSI-low dagegen überwogen deutlich die nicht methylierten Fälle.



**Abb.59: Korrelation zwischen MS-Status und p16-Methylierung,  $p=0,039$**

MSI-high-Tumoren zeigten in 9 von 16 Fällen (56,25%) eine MLH1-Methylierung, bei MSS- und MSI-low-Tumoren war kein einziger Fall methyliert.

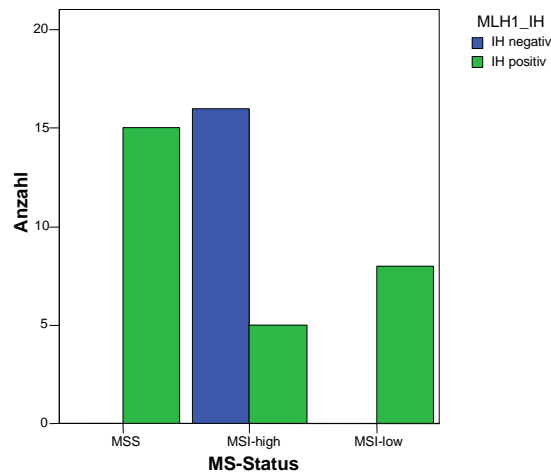


**Abb.60: Korrelation zwischen MS-Status und MLH1-Methylierung,  $p=0,000$**

Während CIN-high-Tumoren also mit einer fehlenden Methylierung korrelierten (vgl. 3.4.4), zeigen MSI-high Tumoren häufiger eine vorhandene MLH1- und p16-Methylierung (vgl. Übersichtstabelle Tab.41 im Anhang).

### **3.9.5 MS-Status und Immunhistochemie von MLH1, MSH2 und MSH6**

Bei den MSI-high-Tumoren waren 16 von 21 MLH1-IH-negativ, bei MSS- und MSI-low-Tumoren dagegen waren alle IH-positiv. Diese Ergebnisse passen auch zu denen der Korrelation des CIN-Status mit der Immunhistochemie (vgl. 3.4.5), wo die „CIN-high“-Tumoren überwiegend „IH-positiv“ waren.

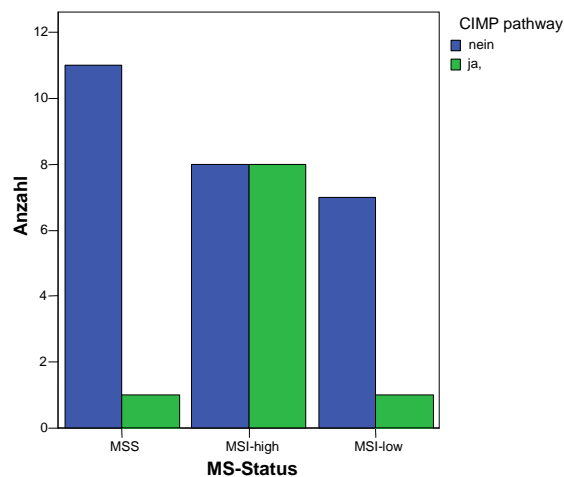


**Abb.61: Korrelation zwischen MS-Status und MLH1-IH,  $p=0,000$**

### 3.9.6 MS-Status und CIMP-Pathway

Ergebnisse bezüglich des CIMP-Pathway lagen bei 36 von 50 Fällen vor.

Während bei MSI-high-Tumoren gleich viele Fälle CIMP-positiv wie CIMP-negativ waren, überwogen bei MSS- und MSI-low-Tumoren deutlich die CIMP-negativen, wiederum passend dazu, dass chromosomal instabile Tumoren eher CIMP-negativ waren (vgl. 3.4.6).



**Abb.62: Korrelation zwischen MS-Status und CIMP-Pathway,  $p=0,039$**



### 3.9.7 MS-Status und $\beta$ -catenin

MSI-high-Tumoren korrelierten positiv mit einer fehlenden  $\beta$ -catenin-Expression im Kern. Am deutlichsten wurde dieser Zusammenhang für eine  $\beta$ -catenin-Expression von 1% und  $\geq 10\%$  im Zellkern (vgl. Übersichtstabelle Tab.41 im Anhang). Auch diese Ergebnisse passen dazu, dass „CIN-high“-Tumoren mit einer positiven  $\beta$ -catenin-Expression im Zellkern korrelieren.

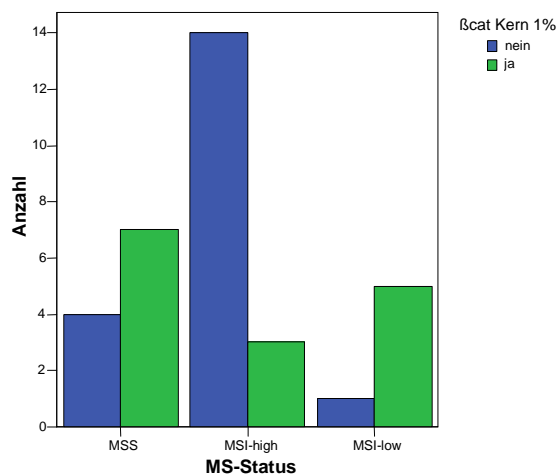


Abb.63: Korrelation zwischen MS-Status und  $\beta$ -cat-Expr. von 1%,  $p=0,005$

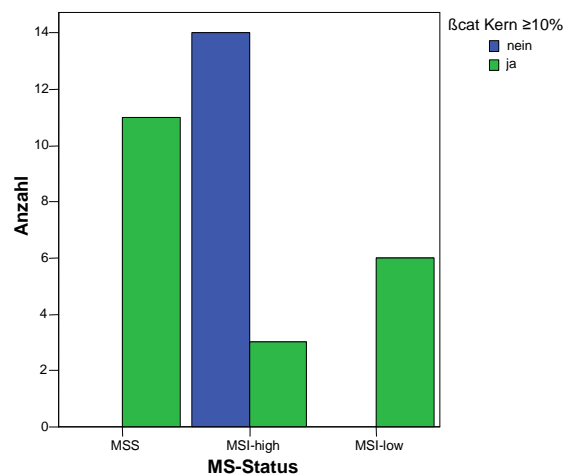


Abb.64: Korrelation zwischen MS-Status und  $\beta$ -cat-Expr. von  $\geq 10\%$ ,  $p=0,000$

## 3.10 Deskription der FISH-Ergebnisse von Einzelfällen

Unter den 50 Karzinomen, die in die oben genannten Gruppen eingeteilt wurden, gab es einzelne Fälle, die besondere Verteilungsmuster der Centromeren (CEP3, CEP7, CEP17) oder andere Auffälligkeiten zeigten.

Bei drei MSI-high-Fällen (Tu-Nr. 13, 17 und 42) und einem MSS-Fall (Tu-Nr. 46) fanden sich zwei verschiedene Chromosomenmuster. Eine Zellpopulation hatte große Zellkerne mit tetraploidem Chromosomensatz und kam in einem Fall (Tu-Nr. 17) sogar häufiger vor als die zweite Zellpopulation, die einen weitgehend stabilen, diploiden Chromosomensatz aufwies. Ob diese Zellen tatsächlich amplifiziert waren oder sich lediglich in der Mitose befanden, bleibt offen. Die drei MSI-high-Fälle wurden dadurch gleichzeitig als „CIN-high“ klassifiziert, der MSS-Fall dagegen wurde je nach CIN-Definition entweder als „CIN-low“ (bei CIN: %Zellen CEPs  $> 4 \times \%NG$ ) bzw. „CIN-negativ“ (bei CIN: CEPsMWert  $> 1 \times SD$ ) gewertet.

Ein auffälliges 3:2-Verhältnis von CEP7 zu CEP3 (Green zu Red) zeigte sich bei drei MSI-high-Fällen (Tu-Nr. 1, 16, 41), einem MSI-low-Fall (Tu-Nr. 30) und einem MSS-Tumor (Tu-Nr. 29). Alle genannten Tumoren wurden hierdurch mindestens als „CIN-low“ klassifiziert,

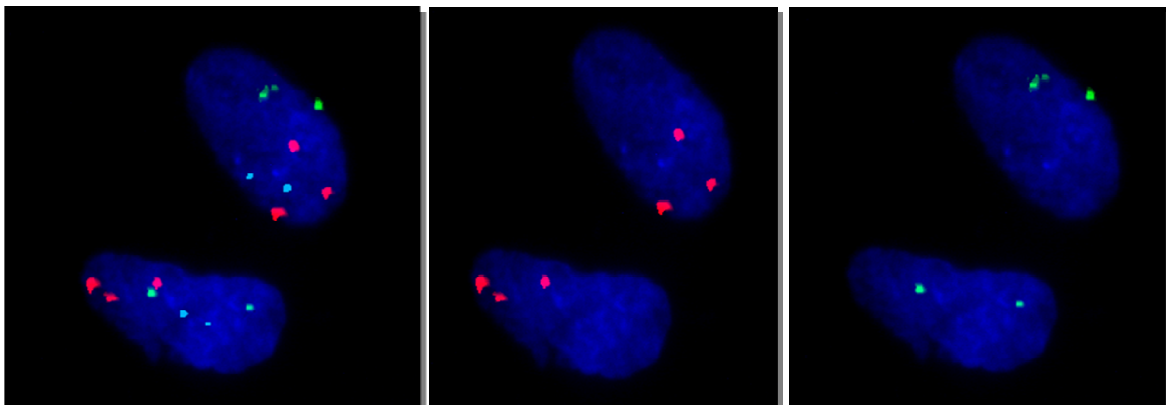
ein MSI-high-Fall (Tu-Nr.1) bei der CIN-Definition (CIN: %Zellen CEPs>4x%NG) sogar als „CIN-high“.

Eine weitere Gruppe von vier MSI-high-Tumoren (Tu-Nr. 3, 4, 6 und 40) und einem MSS-Tumor (Tu-Nr. 22) zeigte ein auffälliges 2:3-Verhältnis von CEP7 zu CEP3 (Green zu Red). Tu-Nr. 3 war zugleich „CIN-negativ“, Tu-Nr. 4 je nach CIN-Definition „CIN-low“ (CIN: CEPsMWert>1xSD) oder „CIN-high“ (CIN: % Zellen CEPs>4x%NG) und Tu-Nr. 6 und 40 waren „CIN-low“, wobei bei letzterem zusätzlich ein 2:4- Verhältnis von CEP7 zu CEP3 vorkam. Der MSS-Fall (Tu-Nr. 22) wurde je nach CIN-Definition als „CIN-low“ (CIN: % Zellen CEPs>4x%NG) oder „CIN-negativ“ (CIN: CEPsMWert>1xSD) klassifiziert.

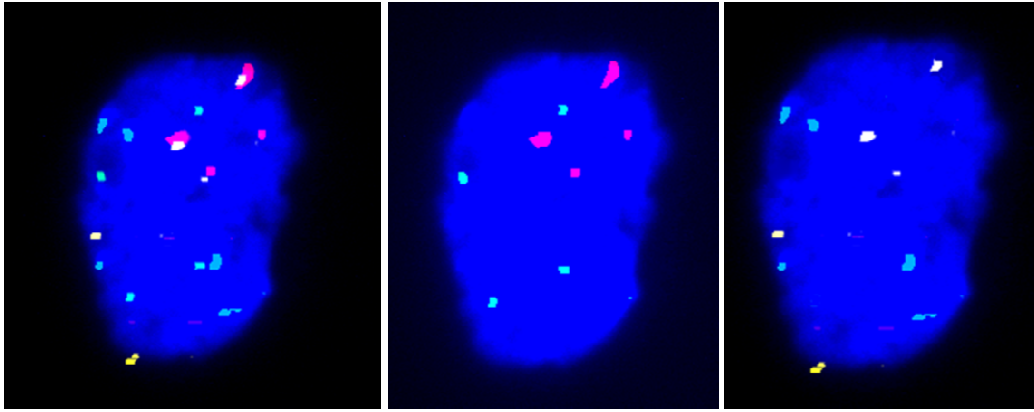
Bei einem weiteren MSS-Fall (Tu-Nr. 33), der auch „CIN-high“ war, fanden sich zwei verschiedene Gruppen von Tumorzellen. Einerseits riesige Zellkerne mit sehr stark amplifizierter Chromosomenzahl und andererseits kleinere Zellkerne, die weniger stark amplifiziert zu sein schienen.

Zwei MSS-Fälle (Tu-Nr. 25 und 47) und ein MSI-low-Fall (Tu-Nr.24), die zugleich „CIN-high“ bzw. Tu-Nr. 25 bei der CIN-Definition „CIN:CEPsWert>1xSD“ nur „CIN-low“ waren, zeigten ebenfalls zwei verschiedene Chromosomenmuster. Eines davon war sehr stark amplifiziert (und kam bei Tu-Nr. 24 und 25 selten vor), das andere wies ein auffälliges 2:3-Verhältnis von CEP7 zu CEP3 (Green zu Red) auf.

Um diese Gruppen von Tumoren eindeutig mit bestimmten klinisch-pathologischen oder molekularen Parametern in Verbindung bringen zu können, war die Fallzahl zu gering.



**FISH-Bild 6: Beispiel für ein auffälliges 2:3-Verhältnis von CEP7 zu CEP3 (Green zu Red)**



**FISH-Bild 7: Beispiel für eine Tumorzelle mit tetraploidem Chromosomensatz**

## **4. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurden 50 kolorektale Karzinome zur Ermittlung der chromosomalen Instabilität mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht und die Ergebnisse mit klinisch-pathologischen und molekularen Parametern korreliert. Dazu zählten der MS-Status, die Promotormethylierung von hMLH1, p14, p15 und p16, die immunhistochemische Expression der MMR-Proteine MLH1, MSH2 und MSH6 sowie die immunhistochemische Expression von Maspin im Zellkern, der CIMP-Pathway und die  $\beta$ -catenin-Akkumulation im Zellkern.

Die FISH wurde, wie im „Abschnitt Material und Methoden“ beschrieben, mittels drei Centromer- und einer Lokus-spezifischen Sonde durchgeführt (Red CEP3, Green CEP7, Aqua CEP17, p16 (9p21)). Für jeden Tumor wurde die Signalzahl in jeder Zelle gezählt und anschließend der Mittelwert, also die durchschnittliche Zahl an Signalen pro Zelle für jede Einzelfarbe in einem Tumor, bestimmt. Um bei der statistischen Auswertung eine Vergleichsgruppe zu haben, wurde zusätzlich Normalgewebe mit FISH untersucht. Schließlich wurde über den Vergleich mit dem Normalgewebe, unter Betrachtung der Einzelmarker CEP3, CEP7 und CEP17, festgelegt, ob ein Tumor eine chromosomale Instabilität zeigt und in welcher Ausprägung („CIN-negativ“, „CIN-low“ oder „CIN-high“). Die exakten „CIN“-Definitionen sind im Ergebnissteil beschrieben, ebenso die Definition für das Vorhandensein eines LOH oder einer homozygoten Deletion des Tumorsuppressorgens p16 (9p21) (vgl. 3.2.1 und 3.2.2).

Es ist gelungen, mittels FISH eine chromosomale Instabilität bei kolorektalen Karzinomen zu detektieren und anhand der Ausprägung verschiedene Tumorgruppen einzuteilen.

#### 4. Zusammenfassung

Die Untersuchung des Normalgewebes erwies sich als sehr wichtig. Es zeigte sich an Hand der Mittelwerte und der Prozentzahl alterierter Zellen (vgl. 3.2.1), dass sich im Normalgewebe fast ausschließlich zwei Kopien der entsprechenden Centromere fanden, was dafür spricht, dass die FISH eine zuverlässige Methode ist, um numerische Veränderungen der Chromosomenzahl in Zellen von Paraffinmaterial und Frischgewebe („Touch-Präparaten“) zu ermitteln. Für eine zuverlässige Beurteilung der Tumorzellen ist eine vergleichende Analyse von Normalgewebe nötig, um mögliche Artefakte, etwa durch sich in der Mitose befindende Zellen, richtig zu interpretieren.

Im Anhang sind in der Übersichtstabelle Tab. 42 alle klinisch-pathologischen und molekularen Parameter der 50 untersuchten Einzelfälle zusammengefasst.

Bei der Korrelation mit dem MS-Status zeigte sich, dass „CIN-negativ“ mit MSI-high korreliert, „CIN-high“ mit MSS und „CIN-low“ eine Art Zwischengruppe darstellt, mit einem Überwiegen von MSI-Tumoren. Die Tabellen Tab.22/23 (vgl. 3.4.1) zeigen die Verteilung der Tumoren in die Tumorgruppen für die beiden verwendeten „CIN-Definitionen“.

Tab.22: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,001
MSS	19	38,00%	3	6,00%	3	6,00%	13	26,00%	
MSI-high	22	44,00%	11	22,00%	8	16,00%	3	6,00%	
MSI-low	9	18,00%	0	0,00%	2	4,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)									

Tab.23: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-low		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,003
MSS	19	38,00%	1	2,00%	3	6,00%	15	30,00%	
MSI-high	22	44,00%	9	18,00%	7	14,00%	6	12,00%	
MSI-low	9	18,00%	0	0,00%	2	4,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									

Nur knapp über die Hälfte der „CIN-high“-Fälle sind MSS (13 von 23=56,52 % bzw. 15 von 28=53, 57%), die restlichen verteilen sich auf die MSI-low- und MSI-high-Gruppe.

Wir fanden also eine Gruppe von Tumoren, die sowohl eine chromosomale Instabilität (CIN-high) als auch eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high) zeigt. Je nach verwendeter „CIN-Definition“ liegt der Anteil dieser Gruppe bei 6% bzw. 12 % aller Tumoren. Vice versa gibt es eine kleinere Gruppe mit weder CIN noch MSI. Der Anteil liegt hier bei 6% bzw. 2% aller Tumoren.

Bei der Korrelation des CIN-Status mit den klinisch-pathologischen Parametern (vgl. Tab.18/19) zeigte sich, dass „CIN-high“-Tumoren einen höheren Differenzierungsgrad haben.

14 von 23 (=60,87%) bzw. 18 von 28 (=64,28%) „CIN-high“-Tumoren haben ein G2-Grading, bei „CIN-negativ“ und „CIN-low“-Fällen überwiegen die G3-Fälle. Außerdem ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-low“-Tumoren und einem N1-Lymphknotenstatus. Korrelierte man den MS-Status mit klinisch-pathologischen Parametern, so zeigten sich folgende Zusammenhänge (vgl. Tab. 40):

MSI-high-Tumoren zeigen in 68,18% (15 von 22) ein G3-Grading und sind im Vergleich zu MSS- und MSI-low-Tumoren statistisch signifikant mit einem geringeren Differenzierungsgrad assoziiert.

MSS-Tumoren sind häufiger im distalen Kolon (13 von 18=72,22%) lokalisiert und MSI-high-Tumoren meist im proximalen Kolon (16 von 22 =72,73%). MSI-low-Tumoren verteilen sich fast gleichmäßig auf distales (5 Tumoren) und proximales (4 Tumoren) Kolon, scheinen also eine Art Mittelstellung einzunehmen.

MSI-high kommt häufiger bei Frauen vor (12 von 22=54,54%), MSS häufiger bei Männern (78,95%), was auch dazu passt, dass „CIN-negativ“ häufiger bei Frauen und „CIN-high“ häufiger bei Männern vorkommt.

Ein statistisch hoch signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen „CIN-high“-Tumoren und dem Auftreten von LOHs sowohl bei den MS-Einzelmarkern (vgl. Abb. 30-33) als auch beim Tumorsuppressorgen p16(9p21) (vgl. Tab.28/29).

„CIN-high“-Tumoren zeigen eine positive immunhistochemische MLH1-Expression (18 von 20=90% bzw. 19 von 24=79,17%) und häufiger keine Promotorhypermethylierung, was für p15- (15 von 17=88% bzw. 18 von 20=90%) und MLH1-Methylierung (16 von 17=94% bzw. 17 von 20=85%) je nach „CIN-Definition“ statistisch signifikant war (vgl. Tab. 26/27 im Anhang).

Korrelierte man den MS-Status mit Promotormethylierung und Immunhistochemie der MMR-Proteine, ergaben sich folgende Zusammenhänge: MSI-high korreliert positiv mit einer MLH1- und p16-Promotormethylierung und einer negativen immunhistochemischen Expression von MLH1.

Weiterhin zeigen CIN-Tumoren den Trend unabhängig vom CIMP-Pathway vorzukommen und zeigen häufiger eine Akkumulation von  $\beta$ -catenin im Zellkern. Betrachtete man die Korrelation des MS-Status mit CIMP, so fiel auf, dass CIMP-positiv mit MSI-high korreliert. Zwar war die Hälfte der MSI-high-Fälle CIMP-negativ, bei den MSS- und MSI-low-Fälle war jedoch nur je ein Tumor CIMP-positiv.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass mittels FISH bei kolorektalen Tumoren eine chromosomale Instabilität detektiert werden kann, dass diese chromosomale Instabilität unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann und dass sich, bei Korrelation mit dem MS-Status, verschiedene Tumorgruppen ergeben. Fasst man CIN-high und CIN-low als CIN-positiv zusammen und zählt man MSI-low zur Gruppe der MSS-Tumoren zeigen sich die prozentualen Verteilungen wie in Tab. 43 und 44 dargestellt: CIN-positiv/MSI-negativ (50% bzw. 54%), CIN-negativ/MSI-positiv (22% bzw. 18%), CIN-positiv/MSI-positiv (22% bzw. 26%) und CIN-negativ/MSI-negativ (6% bzw. 2%).

Tab.43: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status						
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-positiv	
	n	%	n	%	n	%
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%
MSS	28	56,00%	3	6,00%	25	50,00%
MSI	22	44,00%	11	22,00%	11	22,00%
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)						

Tab. 44: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status						
	Tu ges.		CIN-negativ		CIN-positiv	
	n	%	n	%	n	%
MS-Status	50	100,00%	10	20,00%	40	80,00%
MSS	28	56,00%	1	2,00%	27	54,00%
MSI-high	22	44,00%	9	18,00%	13	26,00%
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)						

## 5. Diskussion

In der Diskussion folgt der Vergleich unserer eigenen Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen. Auf die Komplexität der Pathogenese des CRC soll anhand von neueren Erkenntnisse noch einmal eingegangen werden.

### 5.1 Korrelation von CIN und MSI mit klinisch-pathologischen Parametern

In dieser Arbeit zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen chromosomaler Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und dem Überleben (vgl. Tab. 19 und 40).

Wie unter 3.3.7 beschrieben, war der Nachbeobachtungszeitraum in vielen Fällen zu kurz, um hier valide Ergebnisse erwarten zu können. Außerdem lag bei einem Teil der Patienten der

Diagnosezeitpunkt weniger als 36 Monate zurück, so dass diesen eine Überlebensrate  $\geq 36$  Monate zugewiesen wurde, wovon nicht automatisch ausgegangen werden darf.

In vielen anderen Arbeiten wurde beschrieben, dass aneuploide Tumoren prognostisch ungünstiger sind als diploide oder nahezu diploide (Witzig et al., 1991; Tsuchiya et al., 1992; Pietra et al., 1998). Dieser Zusammenhang passt auch dazu, dass „CIN-high“ häufig mit TP53-Mutationen einhergeht, was an sich mit einer schlechteren Prognose korreliert (Chang et al., 2006). Viele Arbeitsgruppen haben eine bessere Prognose bei MSI-high-Tumoren beschrieben (Thibodeau et al., 1993; Gryfe et al., 2000; Kohonen-Corish et al., 2005; Popat et al., 2005; Ribic et al., 2003; Wright et al., 2005; Chang et al., 2006), was sich in dieser Arbeit nicht eindeutig zeigte.

Bei CIN und Differenzierungsgrad ergab sich, dass „CIN-high“ tendenziell mit einem höheren Differenzierungsgrad (G2) einhergehen, besonders deutlich wurde dies bei CEP7, etwas weniger bei CEP17 (vgl. Tab. 34-37 im Anhang). Diese Ergebnisse passen dazu, dass in die „CIN-high“-Gruppe viele MSS-Tumoren eingeschlossen sind, die im Gegensatz zu MSI-high-Tumoren besser differenziert sind. MSI-high-Tumoren korrelierten in dieser Arbeit mit einem geringeren Differenzierungsgrad (vgl. Tab. 40), was im Einklang mit denen Ergebnissen vieler anderer Arbeitsgruppen steht (Kim et al., 1994; Raut et al., 2004; Chang et al., 2006).

Weitere für MSI-high typische Eigenschaften wie muzinöser Zelltyp und peritumorale Lymphozyteninfiltration („Crohn's like inflammation“) (Kazama et al., 2005; Prall et al., 2004; Phillips et al., 2004; Dolcetti et al., 1999) wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Zusammenhänge bei der Tumorlokalisation, dass MSS-Tumoren häufiger im distalen Kolon lokalisiert sind und MSI-high-Tumoren meist im proximalen Kolon, wurden bereits vielfach vorbeschrieben (Thibodeau et al., 1993; Kim et al., 1994; Chang et al., 2006; Kazama et al., 2005).

Kolorektale Karzinome mit MSI werden mit höheren T-Stadien (häufig T3-Tumoren) und seltenem Lymphknotenbefall sowie dem selteneren Auftreten von Metastasen assoziiert, wozu die Ergebnisse aus dieser Arbeit passen, dass T1-Tumoren ausschließlich in der MSS-Gruppe vorkamen (vgl. Tab. 40).

Ein häufigeres Auftreten von MSI-high bei Frauen wurde bereits beschrieben (Søreide et al., 2006). Auch in unserer Arbeit war der Anteil an MSI-Tumoren bei Frauen mit 12 von 21 (=57,14%) größer als bei Männern (10 von 29=34,48%) (vgl. Tab. 40). Knapp über die Hälfte aller MSI-high-Tumoren (12 von 22=54,55%) kam bei Frauen vor.

## **5.2 Die verschiedenen Tumorgruppen**

Die Kastengrafiken Abb.1 und Abb.2 im Ergebnissteil (vgl. 3.2.2) mit dem prozentualen Anteil alterierter Zellen in den Tumorgeweben im Vergleich zum Normalgewebe zeigen, dass auch MSI-Tumoren alterierte Zellen haben, wenn auch im Durchschnitt weniger ausgeprägt als MSS-Tumoren. So liegt der Median alterierter Zellen bei den MSI-Tumoren bei 38,34% versus 81,5% bei den MSS-Tumoren. Allerdings scheinen bei den MSI-Tumoren Einzelfälle zum Teil deutlich alteriert zu sein (vgl. oberer „Whisker“ der MSI-Tu-Box, entsprechend einer Alteration von 82,50% der Zellen dieses Tumors).

In dieser Arbeit wurden CIN-Tumoren nicht nur in „CIN-positiv“ oder „CIN-negativ“ eingeteilt, sondern es wurden drei Gruppen von Tumoren unterschieden, nämlich „CIN-negativ“, „CIN-low“ und „CIN-high“.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten CIN-Tumoren einzuteilen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die gewählte Definition der „CIN“. In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten von Definitionen genannt und zwei für die detaillierte Auswertung verwendet (vgl. 3.2). Beim Vergleich mehrerer Arbeiten untereinander, treffen meist verschiedene „CIN“-Definitionen und eine daraus resultierende unterschiedliche Einteilung der „CIN“-Gruppen aufeinander.

Je nach verwendetem Centromer-Marker ergab sich eine unterschiedliche Zuordnung in die „CIN-high“- „CIN-negativ“- oder „CIN-low“- Tumorgruppe.

Wie bereits im Ergebnissteil dargestellt, wurden die von uns definierten Gruppen der chromosomalen Instabilität mit dem MS-Status korreliert. Dabei zeigte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-negativ“ und MSI, und weniger deutlich zwischen „CIN-high“ und MSS.

Allerdings gab es in jeder CIN-Gruppe Tumoren, die einer anderen MS-Gruppe zugehörig waren: Drei von 14 (21,4 %) bzw. einer von zehn (10%) (je nach verwendeter Definition; vgl. Tab. 20/21) „CIN-negativ“-Tumoren zeigten keine Mikrosatelliteninstabilität (MSS), und drei von 23 (13 %) bzw. sechs von 28 (21,4%) „CIN-high“-Fällen waren gleichzeitig mikrosatelliteninstabil (MSI). In der „CIN-low“-Gruppe war die Zuteilung nicht so eindeutig, vielmehr schien diese Gruppe von Tumoren eine Art Mittelstellung einzunehmen. Betrachtete man die Gruppe der „CIN-low“-Tumoren nicht gesondert, sondern ordnete man sie entweder der „kein CIN-high“- oder der „CIN-positiv“-Gruppe zu, ergaben sich folgende Zusammenhänge (vgl. Tab. 43/44 und Tab. 45/46): Bei den „kein CIN-high“-Tumoren, die sich aus den „CIN-low“-



und den „CIN-negativ“-Fällen zusammensetzten, war dann die Gruppe der MSS-Tumoren mit 29,6% (8 von 27) bzw. 27,3 % (6 von 22) größer. In der „CIN-positiv“-Gruppe, die sich aus „CIN-high“ und „CIN-low“ zusammensetzte, war der MSI-Anteil mit 30,6% (11 von 36) bzw. 32,5% (13 von 40) größer.

Tab.45: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status						
	Tu ges.	kein CIN-high		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%
MS-Status	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%
MSS	28	56,00%	8	16,00%	20	40,00%
MSI	22	44,00%	19	38,00%	3	6,00%
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)						

Tab. 46: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status						
	Tu ges.	kein CIN-high		CIN-high		
	n	%	n	%	n	%
MS-Status	50	100,00%	22	44,00%	28	56,00%
MSS	28	56,00%	6	12,00%	22	44,00%
MSI-high	22	44,00%	16	32,00%	6	12,00%
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)						

Noch komplexer gestalteten sich die Zusammenhänge, wenn man nicht nur zwischen MSS und MSI sondern zusätzlich noch eine MSI-low-Gruppe unterschied: Für die Gruppe der „CIN-negativ“- und der „CIN-low“-Tumoren änderte sich hierdurch wenig, in der Gruppe der „CIN-high“-Tumoren zeigte sich, dass nicht nur die bereits erwähnten 13% bzw. 21% an MSI-high-Tumoren vorkamen, sondern zusätzlich noch 7 von 23 (30,4%) bzw. 7 von 28 (25%) MSI-low-Fälle (vgl. Tab. 22/23).

Diese Zusammenhänge wurden zusätzlich von der anderen Seite her aufgerollt, nämlich wie sich bei entsprechendem MS-Status die Tumoren auf die unterschiedlichen CIN-Gruppen verteilen: Während die MSS- und MSI-low-Tumoren eine deutliche Zugehörigkeit zur „CIN-high“- Gruppe zeigten, waren die MSI-high-Tumoren zwar etwas häufiger der „CIN-negativ“- Gruppe zuzuordnen, zeigten jedoch auch einen erheblichen Anteil an „CIN-high“- und „CIN-low“-Tumoren (3 von 22=13,6% bzw. 6 von 22=27,3% und 8 von 22=36,4% bzw. 7 von 22=31,8% ) (vgl. Tab. 47/48).

Tab.47: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		MSS		MSI-high		MSI-low		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
CIN-Status <sup>1</sup>	50	100,00%	19	38,00%	22	44,00%	9	18,00%	0,001
CIN-neg	14	28,00%	3	6,00%	11	22,00%	0	0,00%	
CIN-low	13	26,00%	3	6,00%	8	16,00%	2	4,00%	
CIN-high	23	46,00%	13	26,00%	3	6,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPs MWert>1xSD)									

Tab.48: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zum MS-Status									
	Tu ges.		MSS		MSI-high		MSI-low		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
CIN-Status <sup>1</sup>	50	100,00%	19	38,00%	22	44,00%	9	18,00%	0,003
CIN-neg	10	20,00%	1	2,00%	9	18,00%	0	0,00%	
CIN-low	12	24,00%	3	6,00%	7	14,00%	2	4,00%	
CIN-high	28	56,00%	15	30,00%	6	12,00%	7	14,00%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									

Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass eine strikte Trennung in CIN und MSI nicht möglich ist, da es Gruppen von Tumoren gibt, die entweder beide Arten der genetischen Instabilität zeigen oder keine.

Man könnte an dieser Stelle argumentieren, dass sich diese Zusammenhänge nur durch die hier gewählten Definitionen so ergeben haben. Dagegen spricht zum einen, dass mit zwei unterschiedlichen Definitionen für CIN tendenziell ähnliche Ergebnisse erreicht wurden und zum anderen, dass andere Arbeitsgruppe ähnliche Ergebnisse erzielt haben, auf die im Folgenden eingegangen werden soll:

Eine zentrale Stellung nimmt die Arbeit von Goel et al. aus dem Jahr 2003 ein. Hier wurden insgesamt 209 sporadische CRC untersucht. Als Nachweis für CIN wurden LOHs der Chromosomenarme 1p, 2p, 3p, 5p, 17p und 18p verwendet und der MS-Status mit einem vom „National Cancer Institute“ empfohlenen Panel ermittelt. Es zeigten sich 65% MSS, 21% MSI-low und 14% MSI-high-Fälle. In unserer Arbeit wurden bewusst MSI- mit MSS-Fällen verglichen und die Anzahl an Tumoren war mit 50 insgesamt geringer. Die Verteilung war daher anders: Es fanden sich 38% MSS Fälle, 18% MSI-low-Fälle und 44% MSI-high-Fälle, was natürlich nicht der normalen Verteilung bei sporadischen Tumoren entspricht.

Bei Goel et al. zeigten 51% der Tumoren zumindest einen LOH-Event und wurden damit als „CIN-positiv“ gewertet. Bei uns waren bei der Definition „Mittelwert +/- einfache Standardabweichung“ 46% der Tumoren „CIN-high“, 26% „CIN-low“ und 28% „CIN-negativ“. Für die zweite Definition „prozentualer Anteil alterierter Zellen im Tumor > 4x prozentualer Anteil alterierter Zellen im Normalgewebe“ zeigten sich 56% „CIN-high“, 24% „CIN-low“ und

20% „CIN-negativ“-Tumoren (vgl. Tab. 22/23). Insgesamt war der Anteil an „CIN-high“-Tumoren mit ca. 50% ähnlich wie bei Goel et al., 2003.

Goel et al. fanden, dass 6,6% der CIN-positiven-Tumoren gleichzeitig MSI-high waren und 28,0% gleichzeitig MSI-low. Die Gruppe von „CIN-high“-Tumoren, die in unserer Arbeit zusätzlich auch MSI-high war, machte je nach Definition 13% bzw. 21,4% der Fälle aus, wobei man hier die insgesamt überrepräsentierte MSI-Gruppe in unserer Arbeit beachten muss. 30,4% bzw. 25% der „CIN-high“-Tumoren waren zusätzlich auch MSI-low. Schloss man die „CIN-low“-Fälle noch in die CIN-Gruppe mit ein, war der prozentuale Anteil deutlich höher. Dann waren 30,6% bzw. 32,5% der „CIN-positiven“-Tumoren MSI-high (vgl. Tab. 43/44). Bei Goel et. al wurde eine „CIN-low“-Gruppe nicht unterschieden.

Wie bei Goel et al., wo 23,3% der MSI-high-Tumoren auch „CIN-positiv“ waren, zeigte sich auch in unserer Arbeit in der Gruppe der MSI-high ein erheblicher Anteil an „CIN-high“- und „CIN-low“-Tumoren (27,3% bzw. 13,6% und 31,8% bzw. 36,4%) (vgl. Tab. 47/48).

Goel et al. fanden zudem eine Gruppe von 37,8% aller Tumoren, die weder CIN- noch MSI-positiv waren. Bei uns waren 21,4% bzw. 10% (je nach Definition) der „CIN-negativen“-Tumoren MSS (vgl. Tab.43/44). Insgesamt, auch mit zusätzlicher Unterscheidung von MSI-low, zeigten 6% bzw. 2% aller Tumoren keine Form der genetischen Instabilität.

Die Gruppe der MSI-low-Tumoren zeigte sowohl in unserer Arbeit als auch bei Goel et al., ein Überwiegen der CIN-positiven-Fälle (69,8% bei Goel et al., 77,8% „CIN-high“ und 22,2% „CIN-low“ bei uns) (vgl. Tab. 22/23).

Goel et al. fanden in ihrer Arbeit folgende Gruppen: 47,8% CIN-positiv/MSI-high-negativ, 11,0% MSI-high-positiv/CIN-negativ, 3,4% CIN-positiv/MSI-high-positiv und 37,8% CIN-negativ/MSI-high-negativ. In unserer Arbeit ergaben sich folgende Gruppen: 50% bzw. 54% CIN-positiv/MSI-high-negativ, 22% bzw. 18% MSI-high-positiv/CIN-negativ, 22% bzw. 26% CIN-positiv/MSI-high-positiv und 6% bzw. 2% CIN-negativ/MSI-high-negativ (vgl. Tab 43/44).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Tumorgruppen in verschiedenen Arbeiten reproduzierbar sind. Gleichzeitig wird deutlich, dass je nach verwendeter Definition, beispielsweise für „CIN“, die prozentuale Verteilung sich doch deutlich unterscheiden kann. In unserer Arbeit war der Anteil an „CIN-positiven“-Tumoren mit 72% bzw. 80% sehr hoch. Zudem waren die MSI-positiven Tumoren überrepräsentiert. Ob unsere CIN-Definition zu viele Fälle als „CIN-positiv“ charakterisiert, bleibt als Frage bestehen. Allerdings wurde zum Vergleich eine große Zahl an gesunden Zellen heran gezogen, so dass man von repräsentativen Werten ausgehen kann. Der Anteil von knapp 40% der Tumoren in der Arbeit von Goel et al., die „CIN-

negativ“ und MSI-negativ sind, ist sicherlich für die Realität zu hoch, da mittels deren Methode „CIN“ zu detektieren nur LOHs auf bestimmten Loci untersucht wurden und somit sicherlich ein Teil der „CIN-positiven“-Tumoren nicht erfasst wurde. Ein Vergleich zum Normalgewebe, wie in unserer Arbeit, war nicht erfolgt.

Die Frage der prozentualen Verteilung zu beantworten, war nicht das primäre Ziel dieser Arbeit, vielmehr wollte man zeigen, dass es Tumoren gibt, die beide Formen der genetischen Instabilität zeigen und dass FISH eine Methode ist, die zur Detektion von „CIN-positiven“-Tumoren verwendet werden kann. Beide Fragestellungen kann man mit ja beantworten.

Li et al. untersuchten 2003 39 MSI-high und 20 MSS CRCs mit „Comparative Genomic Hybridization“ (CGH) auf chromosomale Inbalancen (CIs), definiert als Verluste oder Gewinne von Chromosomenarmen. Sie fanden „CIs“ bei 70% der MSS-Tumoren und 31% der MSI-Tumoren, was für das Vorhandensein einer CRC-Gruppe mit beiden Typen der genetischen Instabilität spricht. Bei MSI-H-Fällen fanden sie CIs vor allem dann, wenn Mutationen im hRAD50-Gen vorlagen, einem DNA-Reparaturgen, so dass sie annahmen, dass chromosomale Instabilität bei MSI-H-Tumoren über Alterationen des hRAD50 entsteht. Der prozentuale Anteil von 31% MSI-Tumoren mit gleichzeitigem Auftreten von „CIs“ lag etwa zwischen den Ergebnissen von Goel et al. mit 23 % und unseren eigenen mit 50% bzw. 59,1%.

Curtis et al. untersuchten 2000 36 kolorektale Karzinome im Mausmodell mit CGH und Durchflusszytometrie für die chromosomale Instabilität sowie mit PCR für die Mikrosatelliteninstabilität. Sie stellten fest, dass chromosomale Defekte in „RER+“-Karzinomen im Vergleich zu „RER“-Karzinomen gering sind, dass sie jedoch auch bei ersteren vorkommen, und dass es unterschiedliche Muster von chromosomalen Veränderungen gibt, wovon die einen mit dem „RER+“- (Chr 19) und die anderen mit dem „RER“- (8p, 18q) Phänotyp assoziiert werden.

Camps et al. beschrieben 2004 die Koexistenz von CIN und MSI in der KM12-Zellkultur.

Trautmann et. al zeigten kürzlich, dass MSI- und MSS-Tumoren sich zwar signifikant bezüglich Häufigkeit und Art von chromosomalen Alterationen unterscheiden, dass aber MSI-Tumoren ebenfalls unterschiedliche Grade von chromosomaler Instabilität zeigen. Sie untersuchten 23 MSI-high und 23 MSS-Tumoren mit „Array-CGH“, Immunhistochemie und MSI-Analyse mit einem Panel aus sieben MS-Markern. Im Mittel war der Anteil alterierter Gene mit 2,8% bei MSI-high-Tumoren wesentlich niedriger als bei MSS-Tumoren mit 30,7%.

Dennoch zeigten auch „MSI-H“-Tumoren zum Teil ausgeprägte Alterationen, wie etwa Gewinne der Chromosomen 8, 12, und 13 sowie den Verlust von 15q14. Häufige Alterationen in MSS-Tumoren waren dagegen Gewinne von Chromosom 7, 13, 8q und 20 und Verluste von 8p, 17p und 18. Interessant war auch eine bisher unbekannte Deletion auf 16p13.2, die man in 35% der MSI-H- und 21% der MSS-Tumoren mittels FISH fand (Trautmann et al., 2006).

Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Camps et al. 2006, die an 31 kolorektalen Karzinomen (16 MSS und 15 MSI) zeigten, dass numerische Veränderungen nicht nur in MSS-Tumoren vorkommen (MSS: +20, +8q, -8p, -18q, -1p22, -4q26, -15q21; MSI: +22q13; beide: +8q24; +16q24.3; +20q13; -5q21).

Wie auch in der vorliegenden Arbeit stellten einige Arbeitsgruppen fest, dass es einen Teil von Tumoren gibt, die weder dem CIN- noch dem MSI-Phänotyp zugeordnet werden können. Georgiades et al. beschrieben 1999 an 22 primären kolorektalen Karzinomen, dass bei 1/3 der „RER“- Karzinome wenig bis keine chromosomale Instabilität vorkommt, ähnlich wie bei „RER+“- Karzinomen. Diese Tumorgruppe wurde als „RER-/CIN-low“ bezeichnet. Die Gruppe sprach von drei verschiedenen Pathways, von einem „RER+“, einem „RER-“ mit Aneuploidie und einen „RER-“ ohne Aneuploidie. Außerdem beschrieb auch diese Gruppe bei „RER+“- Tumoren einige Chromosomenamplifikationen und -deletionen.

Auch Tang et al. fanden in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2004 an 179 CRC 17%, die „MIN-negativ/CIN-negativ“ waren und 6%, die „MIN-positiv/CIN-positiv“ waren. Diese Gruppe stellte zudem fest, dass „MIN-positiv“-Tumoren mit oder ohne gleichzeitig vorhandene CIN sich hinsichtlich klinisch-pathologischen Eigenschaften und molekularen Parametern nicht voneinander unterscheiden. „MIN-/CIN“-Tumoren zeigten dagegen im Vergleich zu „CIN+/MIN“-Tumoren einen geringeren und/oder muzinösen Differenzierungsgrad, eine geringere TP53-Mutationsrate und eine höhere TP53-Proteinakkumulationsrate, was die „MIN-/CIN“-Tumoren umso mehr als separate Gruppe heraushebt, die über einen anderen Pathomechanismus zu entstehen scheint.

Hawkins et al. beschrieben 2001 30% (14 von 46) sporadischer CRC, die diploid und MSS waren und mit dem früheren Auftreten von Metastasen assoziiert waren. In unserer Arbeit lagen keine Informationen über das Vorhandensein von Fernmetastasen vor.

Auch Yao et al. beschrieben 1999 1/5 von 65 sporadischen CRC als diploid und MSS.

Chan et al. beschrieben 2001 ein häufigeres Vorkommen des diploiden/MSS-Typs bei früh auftretenden Tumoren im jüngeren Lebensalter, welche bei Diagnosestellung häufig bereits in

einem fortgeschrittenen klinisch-pathologischen Stadium mit Lymphknoten- und Fernmetastasen sind.

Im Einklang damit stehen die Ergebnisse von Boardman et al. 2007, die zeigten, dass MSS-Tumoren bei jungen Patienten häufiger diploid sind als die MSS-Tumoren bei alten Patienten (>65J).

Diese Karzinome scheinen sich also biochemisch und phänotypisch von anderen CRC zu unterscheiden, es scheint sich um einen invasiven Phänotypen zu handeln, der mit frühem Auftreten von Metastasen assoziiert wird.

Da in unserer Arbeit nur 6% bzw. 2% aller Tumoren „CIN-negativ/MSI-high-negativ“ waren, konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen oder molekularen Parametern für diese Gruppe von Tumoren ermittelt werden.

Entgegen dem postulierten aggressiven Verhalten zeigten einige Publikationen, dass Patienten mit diploiden Tumoren ein relativ gutes "Outcome" hatten (Zarbo et al., 1997; Purdie et al., 2000; Lanza et al., 1998). Der Unterschied könnte sich dadurch erklären, dass ein kleiner Teil der diploiden MSS-Tumoren eine TP53-Mutation aufweist, was wiederum zu einer schlechteren Prognose zu führen scheint (Chang et al., 2006). Auch bei aneuploiden Tumoren, wo TP53-Mutationen häufiger vorkommen als bei diploiden, werden TP53-Mutationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

### **5.3 Die Rolle von MSI-low**

Bei der Klassifikation der Mikrosatelliteninstabilität wurde in dieser Arbeit zwischen MSS, LOH, MSI-low und MSI-high unterschieden, die MSI-low also als separate Gruppe von Tumoren betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass bezüglich der Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen der chromosomalen Instabilität sich MSI-low genau wie MSS-Tumoren zur „CIN-high“-Gruppe zuordnen lassen, während MSI-high-Tumoren sich anders verteilen. Betrachtet man die prozentuale Anzahl an alterierten Zellen in den verschiedenen Tumorgruppen (vgl. Abb. 55), so zeigte sich diese bei MSI-low- und MSS-Tumoren deutlich größer als bei MSI-high-Tumoren. Mit MSI-low könnte es also eine Gruppe von Tumoren geben, die beides aufweist, eine Mikrosatelliteninstabilität, wenn auch in „reduziertem Maße“ und zugleich eine chromosomale Instabilität, die ähnlich ausgeprägt zu sein scheint wie bei MSS-Tumoren.

Auch bei der Korrelation mit Grading, CIMP-Pathway,  $\beta$ -catenin und immunhistochemischer MLH1-Expression sowie MLH1- und p16-(Promotor)-Methylierung verhielten sich MSI-low-Tumoren immer gleich zu MSS und anders als MSI-high-Tumoren. Nur das weibliche Geschlecht war sowohl bei MSI-high als auch bei MSI-low häufiger betroffen, im Gegensatz zu

MSS, wo das männliche Geschlecht überwog (Zusammenhänge allerdings statistisch nicht signifikant). MSI-low-Tumoren dürfen nicht einfach der MSS-Gruppe zugeordnet werden, sondern müssen als eigenständige bzw. Übergangsgruppe betrachtet werden. MSI-low-Tumoren verteilten sich fast gleichmäßig auf distales und proximales Kolon, und nahmen damit eine Art Mittelstellung zwischen den proximal lokalisierten MSI-high- und den distal lokalisierten MSS-Tumoren ein.

Insgesamt stellt sich die Frage, welche Rolle MSI-low als eigenständige Tumorgruppe spielt. Halford et al. beschrieben 2003, dass MSI-low häufiger bei Tumorentitäten vorkommt, bei denen auch MSI-high auftritt und die in Verbindung mit dem HNPCC-Syndrom bekannt sind (35% der CRC, 32% der Endometriumkarzinome und 26% der Ovarialkarzinome), im Gegensatz zu MSI-high aber nicht von einem defekten MMR-System kommt. Bei MSI-low fanden sich keine Unterschiede zu MSS bzgl. klinisch-pathologischer Parameter und die Existenz eines spezifischen MSI-low-Pathways wurde demnach als fraglich gesehen.

In einer Arbeit aus dem Jahre 2002 zeigte die gleiche Gruppe, dass, wenn man die Zahl an analysierten Mikrosatelliten nur ausreichend hoch wählt, sich die Anzahl an MSI-low-Fälle in jedem Tumorgewebe erhöht.

Laiho et al. bestätigten 2002, dass beim Untersuchen von ausreichend vielen MS-Markern die Mehrzahl der CRC einen bestimmten Grad an Mikrosatelliteninstabilität zeigt. Außerdem vermutete die Gruppe, dass MSS und MSI-low den gleichen molekularen Hintergrund haben und deshalb als eine Gruppe von Tumoren zusammengefasst werden können. Weitere Gruppen beschrieben, dass die Mehrzahl der CRC einen gewissen Grad an Mikrosatelliteninstabilität zeigen, also MSI-low sind (Tomlinson et al., 2002; Guda et al., 2004).

Allerdings gab es auch Arbeitsgruppen, die Unterschiede zwischen MSS und MSI-low zeigten und deshalb eine Trennung für sinnvoll hielten: Jass et al. fanden 1999 eine erhöhte Rate an KRAS-Mutationen bei MSI-low-Tumoren im Gegensatz zu MSS-Tumoren und ein selteneres Auftreten eines 5q-LOH. Whitehall et al. zeigten 2001 eine Korrelation zwischen MGMT-Gen-Promotor-Methylierung und KRAS-Mutationen in MSI-low-Tumoren. Außerdem wurde beschrieben, dass eine reduzierte BCL-2 Expression (Biden et al., 1999), ein höherer Apoptoseindex und lymphozytäre Infiltration mit MSI-low assoziiert sind (Michael-Robinson et al., 2001). Zwischen MSH6-Mutationen und dem MSI-low-Phänotyp wurde eine etwaige Korrelation vermutet, was sich jedoch nicht bestätigte (Parc et al., 2000).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit lassen sich mit der Annahme vereinbaren, dass MSI-low eher den MSS-Tumoren zuzuordnen sind und weniger eine eigenständige Gruppe darstellen,

die sich qualitativ, bzgl. dem zugrunde liegendem Pathway und den klinisch-pathologischen Eigenschaften, von MSI-high- und MSS-Tumoren unterscheidet. MSI-low-Tumoren unterscheiden sich eher quantitativ von MSS dadurch, dass sie häufiger Zellteilungen durchgemacht haben, wodurch sich per se die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines MSI-Events erhöht.

#### **5.4 Die Rolle von „CIN-low“**

„CIN-low“-Tumoren zeigten in dieser Arbeit einige Besonderheiten: Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen „CIN-low“ und einem N1-Lymphknotenbefall, was diese Tumoren als gesonderte Gruppe hervorheben könnte.

„CIN-low“-Tumoren waren häufiger im rechten Kolon lokalisiert, was sicherlich auch daran liegt, dass MSI-Tumoren in der „CIN-low“-Gruppe überwogen (vgl. Tab.20/21).

Auch bei der Altersverteilung hoben sich die „CIN-low“-Tumoren als separate Gruppe hervor, da sie im Gegensatz zu „CIN-high“- und „CIN-negativ“-Tumoren häufiger bei Patienten unter 60 Jahren auftraten (vgl. Tab.18/19 und Abb.10/11).

Bei „CIN-low“-Tumoren war CEP 17 meist nicht alteriert (vgl. Tab.30/31 und Abb.44).

In Bezug auf 9p21-LOHs zeigten „CIN-low“-Tumoren wesentlich seltener einen LOH als „CIN-negativ“- und „CIN-high“-Tumoren (vgl. Abb.42/43).

Andererseits zeigte sich die Gruppe der „CIN-low“-Tumoren häufig als eine Zwischengruppe bzw. eine Übergangsgruppe zwischen „CIN-negativ“ und „CIN-high“.

Beim Differenzierungsgrad überwogen bei „CIN-negativ“ die gering differenzierten G3-Tumoren, bei „CIN-high“ die besser differenzierten G2-Tumoren. In der „CIN-low“-Gruppe war das Verhältnis G2/G3 fast ausgeglichen (vgl. Tab.18/19). Auch bei der Korrelation mit dem MS-Status (vgl. Tab.20/21 und Abb.14/15) sowie den Einzelmarkern APC-d5s346 (vgl. Tab.24/25 und Abb.24), d13s153 (vgl. Abb.28), mycl1 (vgl. Abb.29) und LOH der MS-Marker (vgl. Abb.30-33) kann man die „CIN-low“-Tumoren als Zwischengruppe bezeichnen. Eine Zwischengruppe stellten die „CIN-low“-Tumoren auch bei der Korrelation mit der Immunhistochemie von MLH1 dar (vgl. Tab.26/27 im Anhang und Abb.36).

Möglicherweise lässt sich auch die CIN-negative Gruppe von CRC in zwei Untergruppen aufteilen, nämlich „CIN-stable“ und „CIN-low“, die sich durch das Fehlen bzw. Auftreten einer 18q-Deletion unterscheiden lassen (Rowan et al., 2005).

Insgesamt scheint es eher nicht gerechtfertigt, die „CIN-low“-Karzinome als eigenständige Tumorgruppe zu betrachten. So werden auch in der Literatur häufig verschiedene Grade der



chromosomalen Instabilität beschrieben, diese jedoch weniger mit bestimmten Eigenschaften streng assoziiert.

### **5.5 Verschiedene Pathomechanismen bei Tumoren mit MSI und CIN**

Beide Gruppen von Tumoren entstehen über komplexe Pathomechanismen, die vor allem beim CIN-Phänotyp nicht vollständig geklärt sind. An vielen Stellen kommt es sicherlich auch bei der Entstehung der Tumoren zu Überschneidungen. Dennoch sind zwischenzeitlich viele Gene bekannt, die sich dem einen oder dem anderen Pathway zuordnen lassen.

So bestätigte sich in unserer Arbeit der bekannte Zusammenhang zwischen fehlender immunhistochemischer MLH1-Protein-Expression und MSI-high-Tumoren. Im Zusammenhang damit zeigte sich bei MSI-high auch häufiger eine Promotormethylierung von p16 und, noch deutlicher, von MLH1.

Das häufige Auftreten von LOHs in CIN-Tumoren bestätigte sich in dieser Arbeit ebenfalls: Es ergaben sich statistisch hoch signifikante Zusammenhänge zwischen positiven LOH-Events auf mehreren der getesteten Mikrosatellitenmarker sowie zwischen LOH des Tumorsuppressorgens p16(9p21) und „CIN-high“-Karzinomen.

Tumoren mit CIN haben häufig Mutationen in TP53 und APC (Salahshor et al., 1999; Chang et al., 2006; Cabrera et al., 2005). Im Gegensatz dazu haben MSI-Tumoren Frameshift-Mutationen in Zielgenen wie  $\beta$ -catenin, TGF- $\beta$ RII (Kim et al., 2003) und BAX (Rampino et al., 1997) sowie BRAF-Mutationen (Chang et al., 2006) und dafür weniger Mutationen in KRAS und TP53 (Samowitz et al., 2005; Kim et al., 1994; Cottu et al., 1996). Da sich in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Mikrosatelliteninstabilität oder einem LOH auf TP53 und einer bestimmten Form der genetischen Instabilität zeigte, und da TP53 nicht nach anderen Mutationen untersucht wurde, kann man hierzu keine Aussage im Vergleich treffen.

Für APC wurde unter anderem der Marker APC-d5s346 bzgl. Mikrosatelliteninstabilität und LOH untersucht. Bei „CIN-negativen“-Tumoren fand sich fast ausschließlich eine Mikrosatelliteninstabilität auf diesem Marker, bei „CIN-low“-Tumoren fand sich eine langsam steigende Zahl von MSS und LOH und bei „CIN-high“-Tumoren war der Marker APC-d5s346 entweder mikrosatellitenstabil (MSS) oder zeigte einen LOH.

TGF- $\beta$ RII und KRAS-Mutationsanalysen wurden nicht untersucht, wohl aber die Akkumulation von  $\beta$ -catenin im Zellkern mittels Immunhistochemie.

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen „CIN-high“-Tumoren und positiver  $\beta$ -catenin-Expression im Kern ebenso wie zwischen MSS/MSI-low-Tumoren und positiver  $\beta$ -

catenin-Expression, während MSI-high mit negativer  $\beta$ -catenin-Expression korrelierte. Hier wurde also nicht nach Frameshift-Mutationen gesucht, sondern nach der Expression von  $\beta$ -catenin im Kern.  $\beta$ -catenin scheint sowohl beim CIN- als auch beim MSI-Pathway eine Rolle zu spielen. Hadjihannas et al. zeigten in zwei Arbeiten aus dem Jahre 2006, dass CIN über den Wnt/beta-catenin-pathway entsteht. In einer Arbeit von Mårtensson et al. von 2007 konnte gezeigt werden, dass die nukleäre beta-catenin-Akkumulation signifikant mit einer anormalen TP53-Expression und Aneuploidie, typisch für CIN assoziiert war und bei Patienten im Stadium Dukes B mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse von Kölble et al. aus dem Jahre 2000, dass bei etwa 20% der MSI-H-CRC somatische Mutationen im beta-catenin-Gen vorkommen.

Auch der WNT-Signalweg spielt sowohl bei MSI- als auch bei CIN-Tumoren eine Rolle, nur wird er bei MSS-/CIN-Tumoren über den Verlust oder die Mutation von APC aktiviert, während bei MSI-Tumoren Frameshift-Mutationen von CTNNB1 auftreten (Mirabelli-Primdahl et al., 1999; Salahshor et al., 1999).

Auch TGF- $\beta$  spielt bei beiden Pathomechanismen eine Rolle, bei MSI-Tumoren über Frameshift-Mutationen von TGFBR2 und bei MSS-Tumoren über Mutation oder Verlust von SMAD4 (Markowitz et al., 1995; Woodford-Richens et al., 2001).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass man CIN- und MSI-Tumoren nicht strikt trennen darf, ergibt sich daraus, dass es bei MSI-high-Tumoren regelmäßig zu einer Cyclin-E-Überexpression kommt, obwohl Cyclin E bei der (De)regulation des Zellzyklus in der G1/S-Phase eine wichtige Rolle spielt, wo ja wiederum ein möglicher Ursprung der chromosomalen Instabilität liegt (Sutter et al., 2002).

Untersucht man das genetische Profil von CRC mittels cDNA-Mikro-Array-Analysen, so zeigt sich, dass bei MSI- und MSS-Tumoren unterschiedliche Gen-Expressionen vorliegen. Giacomini et al. identifizierten 2005 mittels dieser Technik 217 Gene, deren Expression sich signifikant zwischen MSI- und MSS-Tumoren unterschied. Sie zeigten, dass es ausreicht, die Expression von nur acht Genen zu untersuchen, um zwischen MSI- und MSS-Tumoren zu unterscheiden.

Fest steht auf jeden Fall, dass CIN durch genetische Defekte in vielen verschiedenen Genen entstehen kann, von denen jedes nur eine Rolle für einen kleinen Anteil dieser Tumoren zu spielen scheint. Dies betont einmal mehr die heterogene Basis der CIN (Cabrera et al., 2005).

## **5.6 Neue Aspekte der Pathogenese beim CRC**

Die Adenom-Karzinom-Sequenz in der Entstehung und Progression des CRC mit einer Reihe aufeinander folgender erworbener genetischer Defekte ist seit langem etabliert (Fearon et al., 1990). Kurz zusammengefasst geht man darin davon aus, dass fortgeschrittene kolorektale Adenome initial zwei APC-Mutationen erwerben, anschließend Mutationen im Onkogen KRAS auftreten und es schließlich zum Verlust des Chromosoms 18q und Verlust oder Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 kommt.

Als sich herausstellte, dass viele CRC verschiedene Formen der genetischen Instabilität erworben haben, wurde dieses schrittweise Model immer komplexer, vor allem deshalb, weil dieser Instabilität nicht immer ein ersichtlicher genetischer Defekt zugrunde liegt. Neben MSI-high- und CIN-Tumoren scheinen noch weitere Tumoren zu existieren, wie beispielsweise die Gruppe der MSI-low-CRCs, deren Ursprung und Bedeutung unklar ist (Tomlinson et al., 2002; Jass et al., 2002a, c; Rowan et al., 2005). Außerdem ist die CIN nach wie vor ein ungenau definiertes Phänomen. Als mögliche Ursachen für CIN wurden bereits verschiedene Möglichkeiten genannt und von anderen widerlegt, wie die TP53-Mutation (Donehower et al., 1995; Williams et al., 1997) oder die Inaktivierung von APC sowie defekte Mitose-Checkpunkte (Fodde et al., 2001; Sieber et al., 2002; Rowan et al., 2005).

Eine strenge Assoziation von CIN und 5q-Deletionen (in der Nähe von APC) könnten dazu führen, dass man annimmt, dass APC-Mutationen zu CIN führen. Der Mechanismus, über welchen Karzinome entstehen, die Mutationen in beiden APC-Genen aufweisen und diploid sind, ist dadurch jedoch nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine 5q-Deletion eine Folge von CIN ist und nicht die zugrunde liegende Ursache (Rowan et al., 2005).

Der genaue Zeitpunkt innerhalb der Tumorgenese wann CIN und MSI auftreten und als zwei voneinander separat zu betrachtende Wege gesehen werden können, wird ebenfalls kontrovers diskutiert. So behaupten einige Autoren, dass CIN und MSI die Tumorgenese initiieren und dafür essentiell sind (Schmutte et al., 1999). Andere gehen davon aus, dass genetische Instabilität während oder nach der Transformation eines Adenoms zu einem Karzinom erworben wird (Sieber et al., 2003).

Hinzu kommt die Erkenntnis, dass es CRC gibt, die weder CIN noch MSI aufweisen (Georgiades et al., 1999), was auch in unserer Arbeit bei 2% bzw. 6% aller Karzinome vorkam. Dies könnte einerseits bedeuten, dass genetische Instabilität nicht essentiell für Tumorentstehung und -wachstum ist oder andererseits, dass noch ein dritter Typ der Instabilität existiert.

Außerdem gibt es neben den genetischen Pathways auch noch epigenetische, wie den „CpG island methylator phenotype“ (CIMP)-Pathway. Über Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen kommt es zum „Gen-Silencing“, was zum Abschalten von Tumorsuppressorgenen führen kann (Toyota et al., 1999). Diese CIMP(+)-CRC wurden wiederum mit MSI-high-Tumoren assoziiert, aber MSS-Tumoren, die CIMP(+) sind, kommen ebenso vor (Hawkins et al., 2002). Auch in unserer Arbeit korrelierte CIMP(+) mit MSI-high (vgl. Tab. 41). Andere Autoren behaupten, dass CIMP(+) keine einheitliche Gruppe von CRC zusammenfasst, sondern nur eine bestimmte Eigenschaft ist (Yamashita et al., 2003).

Goel et al. stellten 2007 CIN und CIMP als zwei voneinander unabhängige und umgekehrt miteinander verknüpfte Mechanismen gegenüber und trafen die Aussage, dass MSI-Karzinome als eine Konsequenz von CIMP entstehen. Doch auch bei dieser Einteilung bleibt eine Gruppe von Tumoren, wie sie auch in dieser Arbeit vorkam, außen vor, nämlich die CIMP(+)-Tumoren, die keine Mikrosatelliteninstabilität zeigen. In der Arbeit von Hawkins et al. machten diese Tumoren immerhin 50% der CIMP(+)-Gruppe aus, in der vorliegenden 20% (2 von 10). Wenn man es also aus dieser Sicht betrachtet, machen CIMP(+)-Tumoren eine eigene Gruppe mit bestimmten klinischen und pathologischen Charakteristika aus und führen im Falle einer Methylierung des MLH1-Promoters zu sporadischen MSI-Karzinomen (Hawkins et al., 2002).

In einer neuen Arbeit von Soreide et al. von 2007, in der Literatur von 2002 bis 2007 über die Karzinogenese und die genetische Instabilität zusammengefasst wurde, sind drei Haupt-Pathways in der kolorektalen Karzinogenese genannt, nämlich CIN, MSI und CIMP.

Die beschriebenen 35 % der CIN-negativen/MSI-negativen Tumoren aus der Arbeit von Goel et al. 2003 könnten möglicherweise durch CIMP entstehen.

In unserer Arbeit zeigte sich der Trend, dass CIN-Tumoren unabhängig vom CIMP-Pathway entstehen, da sie häufiger keine Promotormethylierung zeigten; dies wurde zwar nicht statistisch signifikant, was sich jedoch auch dadurch erklären lässt, dass nur 36 der 50 Tumoren überhaupt bzgl. Promotormethylierung im CIMP-Pathway untersucht worden waren.

Während bei MSI-high-Tumoren gleich viele Fälle methyliert wie nicht methyliert waren, überwogen bei MSS- und MSI-low-Tumoren deutlich die nicht methylierten.

In einer neueren Arbeit zu dieser Thematik aus dem Jahre 2007 zeigte die Gruppe von Goel, dass CIMP sowohl in MSI als auch in MSS-Tumoren vorkommt und beinahe die Hälfte aller sporadischen CRC betrifft und dass CIMP ein separater Subtyp der CRCs ist, der invers mit CIN assoziiert ist.

CIMP und CIN werden als die zwei „Haupt-Pathways“ der Tumorevolution beim sporadischen CRC angesehen. CRCs entstehen durch den Verlust von multiplen Tumorsuppressorgenen und dieser Defekt tritt bei CIN-Tumoren durch Allelverlust, also LOHs auf, bei MSI-Tumoren durch das Unvermögen, einzelne "Mismatches" in Mikrosatellitensequenzen zu reparieren und durch „Methylierungs-assoziiertes-Silencing“ bei Tumoren mit CIMP. Weil aber wiederum die Methylierung des MLH1-Promoters der Grund für MSI bei fast allen sporadischen CRCs ist, scheinen Tumoren mit MSI eine Untergruppe von Tumoren mit CIMP darzustellen. Die Gruppe der HNPCC MSI-positiven Tumoren dagegen entsteht über einen CIMP-unabhängigen Mechanismus.

Insgesamt bleibt die Ätiologie von CIMP weiterhin unklar und es ist nicht geklärt, ob es sich um einen erworbenen Defekt mit eigener Ätiologie handelt oder ob die Methylierungseffekte nur Zufallsevents sind, die während der Tumorgenese positiv selektioniert werden.

### **5.7 Der CIMP (CpG island methylator phenotype)-Pathway**

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass der CIMP-Pathway beim CRC eine wichtige Rolle spielt und zunehmend in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung gerückt ist.

Zugrunde liegt, dass eine Gruppe von Tumoren Methylierung von „CpG-islands“ im Promotorbereich von Genen aufweist, was zur epigenetischen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt (Toyota et al., 1999; Toyota et al., 2000a).

Beispiele, die beim CRC eine Rolle spielen, sind die Inaktivierung des Zellzyklus-Regulators CDKN2/p16/MTS1, welches auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist (Herman et al., 1995; Xu et al., 2004), des Wachstumsinhibitors ER (Issa et al., 1994), des Angiogenese-Inhibitors *THBS1* (Ahuja et al., 1997), des „Metastasen-Unterdrückers“ *TIMP3* (Cameron et al., 1999), des DNA-Reparatur-Gens *MGMT* (Esteller et al., 1999; Xu et al., 2004), und des Mismatch-Repair-Gens *MLH1* (Kane et al., 1997; Xu et al., 2004).

Es scheint zwei verschiedene Methylierungstypen zu geben, die beim CRC mit der Karzinogenese assoziiert werden (Toyota et al., 1999 und 1999a). Neben dem oben beschriebenen Typ C (cancer-specific) gibt es noch einen Typ A (age-related), der altersabhängig zu sein scheint. Die Typ A-Methylierung entsteht als ein normaler Alterungsprozess in gesunden kolorektalen Epithelzellen. Werden davon Gene betroffen, die Zellwachstum und -differenzierung betreffen, kann so eine Prädisposition zur Tumorentwicklung entstehen. Die oben beschriebene Typ C-Methylierung dagegen, betrifft nur einen ganz bestimmten Subtyp von CIMP(+)-Tumoren.

Darunter fallen, die Mehrzahl der sporadischen MSI(+)-Tumoren, die über die Methylierung der Promotorregion von MLH1 entstehen (Toyota et al., 1999a).

Es wurden eine Reihe von Charakteristika identifiziert, die CIMP(+)-Tumoren vermehrt aufweisen, wie Mikrosatelliteninstabilität, Lokalisation im proximalen Kolon, KRAS-Mutation (Toyota et al., 2000), fehlende TP53-Mutation (Toyota et al., 2000), weibliches Geschlecht, höheres Lebensalter, höheres Tumorstadium und vor allem die BRAF V600E Mutation (Hawkins et al., 2002; Toyota et al., 2000; van Rijnsoever et al., 2002; Nagasaka et al., 2004; Kambara et al., 2004).

Weisenberger et al. waren die ersten, die mit einem „fünf-Marker-CpG island panel“ (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 und SOCS1) zeigten, dass die Unterteilung in CIMP-positiv und CIMP-negativ nicht willkürlich ist, dass CIMP(+)-Tumoren fast alle Tumoren mit BRAF-Mutation umfassen und dass sporadische MSI-Tumoren fast ausschließlich als Konsequenz von CIMP-assoziiierter MLH1-Promotormethylierung entstehen (Weisenberger et al., 2006).

Dennoch wurde das CIMP-Konzept immer wieder in Frage gestellt: Yamashita et al. behaupteten 2003, dass die Einteilung in CIMP-positive und -negative-Tumoren mehr oder weniger willkürlich sei, und dass, wenn man die MSI-positiven Tumoren aus der Gruppe heraus nehmen würde, die Mehrzahl der charakteristischen Eigenschaften, abgesehen vom hohen Alter und der proximalen Lokalisation herausfallen würden.

Samowitz et al. konnten 2005 zeigen, dass auch bei MSS-Tumoren CIMP-high-Fälle im Gegensatz zu CIMP-low-Fällen signifikant häufiger folgende Eigenschaften aufweisen: BRAF V600 E-Mutationen, KRAS2-Mutationen, proximale Lokalisation, höheres Tumorstadium, höheres Lebensalter und schlechtere histologische Differenzierung. CIMP-high Tumoren, die gleichzeitig mikrosatelliteninstabil (MSI) waren, zeigten häufiger KRAS-Wildtyp und TP53-Wildtyp, waren schlecht differenziert, proximal lokalisiert, kamen in niedrigeren Tumorstadien vor und wiesen häufiger die BRAF V600E-Mutation auf. Der wichtigste Unterschied, der auftritt, ist also das Vorhandensein von KRAS-Mutationen in CIMP-high-MSS-Tumoren im Gegensatz zu CIMP-high-MSI-Tumoren. Dies kann daran liegen, dass MSI-Tumoren an sich durch einen KRAS-Wildtyp gekennzeichnet sind.

Andererseits zeigt sich durch das Auftreten von CIMP-high in MSS-Tumoren auch, dass man von einem in sich geschlossenen Pathway mit strenger Zusammengehörigkeit von CIMP und MSI nicht ausgehen darf.

In einer Studie von Ogino et al. von 2007 wurden 920 kolorektale Tumore mit PCR (Methylight-Assays) untersucht, um den CpG island-Methylierungs-Status charakterisieren zu

können. Außerdem wurden verschiedene Panels von CpG islands untersucht, die für die Klassifikation von CIMP verwendet werden könnten. Schließlich wurde ein Panel von vier CpG islands (*RUNX3*, *CACNA1G*, *IGF2*, und *hMLH1*) vorgeschlagen, die sehr hohe Sensitivität und Spezifität für CIMP-high zeigten. Diese Methode soll helfen, um zu entscheiden welche MSI-Tumoren sporadisch und welche HNPCC-assoziiert sind, da CIMP-positive MSI-Tumoren fast ausschließlich sporadisch vorkommen. Allerdings waren 20 % der MSI-Tumoren CIMP-negativ. Auch ohne nach HNPCC-typischen Keimbahnmutationen untersucht zu haben, ist klar, dass nicht alle diese HNPCC-Fälle sein können.

In der vorliegenden Arbeit waren sogar 50% der MSI-high-Tumoren CIMP-negativ (vgl. Tab.41 im Anhang), wobei ein Teil durch HNPCC-Fälle erklärt ist.

In einer Arbeit von Suter et al. 2003 wurde gezeigt, dass bei der Verwendung von Zellkulturen für Studien CpG-island-Hypermethylierung ein ubiquitäres Phänomen ist und dass Zellkulturen nur für einen kleinen Anteil der „realen Tumoren“ wirklich repräsentativ zu sein scheinen.

Durch die abschließend noch einmal sehr ausführliche Beschreibung des CIMP-Phänotyps soll klar werden, dass das kolorektale Karzinom eine heterogene Pathogenese hat, dass verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen, die zum Teil sehr charakteristische Eigenschaften haben und zum Teil auch überlappen. Eine strikte Trennung mit klaren Linien für jeden dieser Mechanismen und für die verschiedenen Tumorgruppen würde der Komplexität der kolorektalen Karzinome sicherlich nicht gerecht werden.

## **6. Anhang**



## 6. Anhang

Tab.24: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu MS-Einzelmarker									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
BAT25	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
MSI	22	44,00%	11	22,00%	8	16,00%	3	6,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	3	6,00%	5	10,00%	20	40,00%	
BAT26	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,000
MSI	22	44,00%	11	22,00%	8	16,00%	3	6,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	3	6,00%	5	10,00%	20	40,00%	
BAT40	48	100,00%	14	29,17%	12	25,00%	22	45,83%	0,001
MSI	22	45,83%	11	22,92%	7	14,58%	4	8,33%	
MSS <sup>2</sup>	26	54,17%	3	6,25%	5	10,42%	18	37,50%	
APC d5s346	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,002
MSI	20	40,00%	11	22,00%	6	12,00%	3	6,00%	
MSS	17	34,00%	2	4,00%	4	8,00%	11	22,00%	
LOH	13	26,00%	1	2,00%	3	6,00%	9	18,00%	
APC d5s1720	47	100,00%	14	29,79%	10	21,28%	23	48,94%	0,182
MSI	16	34,04%	6	12,77%	6	12,77%	4	8,51%	
MSS	11	23,40%	4	8,51%	2	4,26%	5	10,64%	
MSS <sup>2</sup>	6	12,77%	2	4,26%	2	4,26%	4	8,51%	
LOH	14	29,79%	2	4,26%	0	0,00%	10	21,28%	
d2s123	50	100,00%	14	28,00%	13	26,00%	23	46,00%	0,028
MSI	20	40,00%	9	18,00%	7	14,00%	4	8,00%	
MSS	21	42,00%	4	8,00%	5	10,00%	12	24,00%	
MSS <sup>2</sup>	7	14,00%	1	2,00%	0	0,00%	6	12,00%	
LOH	2	4,00%	0	0,00%	1	2,00%	1	2,00%	
d18s61	49	100,00%	14	28,57%	13	26,53%	22	44,90%	0,001
MSI	18	36,73%	9	18,37%	7	14,29%	2	4,08%	
MSS	11	22,45%	4	8,16%	2	4,08%	5	10,20%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,08%	0	0,00%	1	2,04%	1	2,04%	
LOH	18	36,73%	1	2,04%	3	6,12%	14	28,57%	
mfd15	43	100,00%	12	27,91%	11	25,58%	20	46,51%	0,142
MSI	18	41,86%	7	16,28%	7	16,28%	4	9,30%	
MSS	18	41,86%	4	9,30%	3	6,98%	11	25,58%	
MSS <sup>2</sup>	4	9,30%	1	2,33%	0	0,00%	3	6,98%	
LOH	3	6,98%	0	0,00%	1	2,33%	2	4,65%	
TP53	42	100,00%	12	28,57%	10	23,81%	20	47,62%	0,185
MSI	6	14,29%	2	4,76%	2	4,76%	2	4,76%	
MSS	16	38,10%	6	14,29%	6	14,29%	4	9,52%	
MSS <sup>2</sup>	9	21,43%	1	2,38%	1	2,38%	7	16,67%	
LOH	11	26,19%	3	7,14%	1	2,38%	7	16,67%	
d18s58	45	100,00%	12	26,67%	12	26,67%	21	46,67%	0,038
MSI	17	37,78%	8	17,78%	5	11,11%	4	8,89%	
MSS	10	22,22%	3	6,67%	3	6,67%	4	8,89%	
MSS <sup>2</sup>	6	13,33%	1	2,22%	2	4,44%	3	6,67%	
LOH	12	26,67%	0	0,00%	2	4,44%	10	22,22%	
d10s197	41	100,00%	13	31,71%	12	29,27%	16	39,02%	0,440
MSI	11	26,83%	4	9,76%	5	12,20%	2	4,88%	
MSS	11	26,83%	3	7,32%	4	9,76%	4	9,76%	
MSS <sup>2</sup>	18	43,90%	6	14,63%	3	7,32%	9	21,95%	
LOH	1	2,44%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,44%	
d13s153	48	100,00%	14	29,17%	12	25,00%	22	45,83%	0,008
MSI	18	37,50%	8	16,67%	7	14,58%	3	6,25%	
MSS	25	52,08%	6	12,50%	3	6,25%	16	33,33%	
LOH	5	10,42%	0	0,00%	2	4,17%	3	6,25%	
mycl1	47	100,00%	14	29,79%	11	23,40%	22	46,81%	0,018
MSI	20	42,55%	9	19,15%	7	14,89%	4	8,51%	
MSS	20	42,55%	5	10,64%	2	4,26%	13	27,66%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,26%	0	0,00%	1	2,13%	1	2,13%	
LOH	5	10,64%	0	0,00%	1	2,13%	4	8,51%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPSMWert>1xSD)									
<sup>2</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar									

## 6. Anhang

Tab.25: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu MS-Einzelmarker									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
BAT25	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
MSI	22	44,00%	9	18,00%	7	14,00%	6	12,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	1	2,00%	5	10,00%	22	44,00%	
BAT26	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,000
MSI	22	44,00%	9	18,00%	7	14,00%	6	12,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	1	2,00%	5	10,00%	22	44,00%	
BAT40	48	100,00%	10	20,83%	12	25,00%	26	54,17%	0,001
MSI	22	45,83%	9	18,75%	7	14,58%	6	12,50%	
MSS <sup>2</sup>	26	54,17%	1	2,08%	5	10,42%	20	41,67%	
APC d5s346	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,001
MSI	20	40,00%	9	18,00%	6	12,00%	5	10,00%	
MSS	17	34,00%	1	2,00%	4	8,00%	12	24,00%	
LOH	13	26,00%	0	0,00%	2	4,00%	11	22,00%	
APC d5s1720	47	100,00%	10	21,28%	11	23,40%	26	55,32%	0,421
MSI	16	34,04%	5	10,64%	5	10,64%	6	12,77%	
MSS	11	23,40%	3	6,38%	3	6,38%	5	10,64%	
MSS <sup>2</sup>	6	12,77%	1	2,13%	1	2,13%	4	8,51%	
LOH	14	29,79%	1	2,13%	2	4,26%	11	23,40%	
d2s123	50	100,00%	10	20,00%	12	24,00%	28	56,00%	0,169
MSI	20	40,00%	7	14,00%	6	12,00%	7	14,00%	
MSS	21	42,00%	3	6,00%	4	8,00%	14	28,00%	
MSS <sup>2</sup>	7	14,00%	0	0,00%	1	2,00%	6	12,00%	
LOH	2	4,00%	0	0,00%	1	2,00%	1	2,00%	
d18s61	49	100,00%	10	20,41%	12	24,49%	27	55,10%	0,008
MSI	18	36,73%	7	14,29%	7	14,29%	4	8,16%	
MSS	11	22,45%	2	4,08%	3	6,12%	6	12,24%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,08%	0	0,00%	0	0,00%	2	4,08%	
LOH	18	36,73%	1	2,04%	2	4,08%	15	30,61%	
mfd15	43	100,00%	9	20,93%	9	20,93%	25	58,14%	0,351
MSI	18	41,86%	5	11,63%	6	13,95%	7	16,28%	
MSS	18	41,86%	3	6,98%	2	4,65%	13	30,23%	
MSS <sup>2</sup>	4	9,30%	1	2,33%	0	0,00%	3	6,98%	
LOH	3	6,98%	0	0,00%	1	2,33%	2	4,65%	
TP53	42	100,00%	8	19,05%	11	26,19%	23	54,76%	0,372
MSI	6	14,29%	2	4,76%	2	4,76%	2	4,76%	
MSS	16	38,10%	4	9,52%	6	14,29%	6	14,29%	
MSS <sup>2</sup>	9	21,43%	1	2,38%	1	2,38%	7	16,67%	
LOH	11	26,19%	1	2,38%	2	4,76%	8	19,05%	
d18s58	45	100,00%	9	20,00%	11	24,44%	25	55,56%	0,083
MSI	17	37,78%	7	15,56%	4	8,89%	6	13,33%	
MSS	10	22,22%	1	2,22%	4	8,89%	5	11,11%	
MSS <sup>2</sup>	6	13,33%	1	2,22%	1	2,22%	4	8,89%	
LOH	12	26,67%	0	0,00%	2	4,44%	10	22,22%	
d10s197	41	100,00%	10	24,39%	11	26,83%	20	48,78%	0,267
MSI	11	26,83%	4	9,76%	5	12,20%	2	4,88%	
MSS	11	26,83%	2	4,88%	3	7,32%	6	14,63%	
MSS <sup>2</sup>	18	43,90%	4	9,76%	3	7,32%	11	26,83%	
LOH	1	2,44%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,44%	
d13s153	48	100,00%	10	20,83%	12	25,00%	26	54,17%	0,049
MSI	18	37,50%	7	14,58%	6	12,50%	5	10,42%	
MSS	25	52,08%	3	6,25%	5	10,42%	17	35,42%	
LOH	5	10,42%	0	0,00%	1	2,08%	4	8,33%	
mycl1	47	100,00%	10	21,28%	11	23,40%	26	55,32%	0,046
MSI	20	42,55%	7	14,89%	7	14,89%	6	12,77%	
MSS	20	42,55%	3	6,38%	3	6,38%	14	29,79%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,26%	0	0,00%	1	2,13%	1	2,13%	
LOH	5	10,64%	0	0,00%	0	0,00%	5	10,64%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									
<sup>2</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar									

## 6. Anhang

Tab.26: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu molekularen Parametern									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
p14-Methylierung	36	100,00%	10	27,78%	9	25,00%	17	47,22%	0,807
ja	11	30,56%	4	11,11%	2	5,56%	5	13,89%	
nein	25	69,44%	6	16,67%	7	19,44%	12	33,33%	
p15-Methylierung	36	100,00%	10	27,78%	9	25,00%	17	47,22%	0,174
ja	5	13,89%	3	8,33%	0	0,00%	2	5,56%	
nein	31	86,11%	7	19,44%	9	25,00%	15	41,67%	
p16-Methylierung	36	100,00%	10	27,78%	9	25,00%	17	47,22%	0,103
ja	10	27,78%	5	13,89%	3	8,33%	2	5,56%	
nein	26	72,22%	5	13,89%	6	16,67%	15	41,67%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	10	27,78%	9	25,00%	17	47,22%	0,029
ja	9	25,00%	4	11,11%	4	11,11%	1	2,78%	
nein	27	75,00%	6	16,67%	5	13,89%	16	44,44%	
MLH1-IH	44	100,00%	13	29,55%	11	25,00%	20	45,45%	0,003
pos	28	63,64%	5	11,36%	5	11,36%	18	40,91%	
neg	16	36,36%	8	18,18%	6	13,64%	2	4,55%	
MSH2-IH	45	100,00%	13	28,89%	11	24,44%	21	46,67%	0,134
pos	43	95,56%	11	24,44%	11	24,44%	21	46,67%	
neg	2	4,44%	2	4,44%	0	0,00%	0	0,00%	
MSH6-IH	44	100,00%	13	29,55%	10	22,73%	21	47,73%	0,172
pos	40	90,91%	10	22,73%	10	22,73%	20	45,45%	
neg	4	9,09%	3	6,82%	0	0,00%	1	2,27%	
CIMP-Pathway	36	100,00%	10	27,78%	9	25,00%	17	47,22%	0,103
ja	10	27,78%	5	13,89%	3	8,33%	2	5,56%	
nein	26	72,22%	5	13,89%	6	16,67%	15	41,67%	
Maspin-IH	39	100,00%	11	28,21%	10	25,64%	18	46,15%	0,733
Expr>10%	37	94,87%	11	28,21%	9	23,08%	17	43,59%	
Expr<10%	2	5,13%	0	0,00%	1	2,56%	1	2,56%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	10	29,41%	8	23,53%	16	47,06%	0,010
ja	15	44,12%	1	2,94%	3	8,82%	11	32,35%	
nein	19	55,88%	9	26,47%	5	14,71%	5	14,71%	
β-catenin (Kern-Expression 2%)	34	100,00%	10	29,41%	8	23,53%	16	47,06%	0,335
ja	5	14,71%	0	0,00%	2	5,88%	3	8,82%	
nein	29	85,29%	10	29,41%	6	17,65%	13	38,24%	
β-catenin (Kern-Expression > 70%)	34	100,00%	10	29,41%	8	23,53%	16	47,06%	0,335
ja	5	14,71%	0	0,00%	2	5,88%	3	8,82%	
nein	29	85,29%	10	29,41%	6	17,65%	13	38,24%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	10	29,41%	8	23,53%	16	47,06%	0,000
ja	20	58,82%	1	2,94%	5	14,71%	14	41,18%	
nein	14	41,18%	9	26,47%	3	8,82%	2	5,88%	
<sup>1</sup> CIN-Status(CEPSMWERT>1xSD)									

## 6. Anhang

Tab.27: CIN-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu molekularen Parametern									
	Tu ges.		CIN-neg Tu		CIN-low Tu		CIN-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
p14-Methylierung	36	100,00%	7	19,44%	9	25,00%	20	55,56%	0,378
ja	11	30,56%	3	8,33%	1	2,78%	7	19,44%	
nein	25	69,44%	4	11,11%	8	22,22%	13	36,11%	
p15-Methylierung	36	100,00%	7	19,44%	9	25,00%	20	55,56%	0,054
ja	5	13,89%	3	8,33%	0	0,00%	2	5,56%	
nein	31	86,11%	4	11,11%	9	25,00%	18	50,00%	
p16-Methylierung	36	100,00%	7	19,44%	9	25,00%	20	55,56%	0,476
ja	10	27,78%	3	8,33%	3	8,33%	4	11,11%	
nein	26	72,22%	4	11,11%	6	16,67%	16	44,44%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	7	19,44%	9	25,00%	20	55,56%	0,106
ja	9	25,00%	4	11,11%	2	5,56%	3	8,33%	
nein	27	75,00%	3	8,33%	7	19,44%	17	47,22%	
MLH1-IH	44	100,00%	9	20,45%	11	25,00%	24	54,55%	0,012
pos	28	63,64%	2	4,55%	7	15,91%	19	43,18%	
neg	16	36,36%	7	15,91%	4	9,09%	5	11,36%	
MSH2-IH	45	100,00%	9	20,00%	11	24,44%	25	55,56%	0,192
pos	43	95,56%	8	17,78%	10	22,22%	25	55,56%	
neg	2	4,44%	1	2,22%	1	2,22%	0	0,00%	
MSH6-IH	44	100,00%	9	20,45%	10	22,73%	25	56,82%	0,132
pos	40	90,91%	7	15,91%	9	20,45%	24	54,55%	
neg	4	9,09%	2	4,55%	1	2,27%	1	2,27%	
CIMP-Pathway	36	100,00%	7	19,44%	9	25,00%	20	55,56%	0,211
ja	10	27,78%	4	11,11%	2	5,56%	4	11,11%	
nein	26	72,22%	3	8,33%	7	19,44%	16	44,44%	
Maspin-IH	39	100,00%	8	20,51%	9	23,08%	22	56,41%	1,000
Expr>10%	37	94,87%	8	20,51%	9	23,08%	20	51,28%	
Expr<10%	2	5,13%	0	0,00%	0	0,00%	2	5,13%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	8	23,53%	7	20,59%	19	55,88%	0,092
ja	15	44,12%	1	2,94%	3	8,82%	11	32,35%	
nein	19	55,88%	7	20,59%	4	11,76%	8	23,53%	
β-catenin (Kern-Expression 2%)	34	100,00%	8	23,53%	7	20,59%	19	55,88%	0,470
ja	5	14,71%	0	0,00%	1	2,94%	4	11,76%	
nein	29	85,29%	8	23,53%	6	17,65%	15	44,12%	
β-catenin (Kern-Expression > 70%)	34	100,00%	8	23,53%	7	20,59%	19	55,88%	0,470
ja	5	14,71%	0	0,00%	1	2,94%	4	11,76%	
nein	29	85,29%	8	23,53%	6	17,65%	15	44,12%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	8	23,53%	7	20,59%	19	55,88%	0,004
ja	20	58,82%	1	2,94%	4	11,76%	15	44,12%	
nein	14	41,18%	7	20,59%	3	8,82%	4	11,76%	
<sup>1</sup> CIN-Status(%ZellenCEPs>4x%NG)									

Tab.32: CEP3 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP3-Alt.		keine CEP3-Alt.		p
	n	%	n	%	n	%	
MS-Status	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,010
MSS	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MS-Status	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,024
MSS	19	38,00%	14	28,00%	5	10,00%	
MSI-high	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSI-low	9	18,00%	6	12,00%	3	6,00%	
9p21-LOH <sup>2</sup>	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,015
ja	35	70,00%	23	46,00%	12	24,00%	
nein	15	30,00%	4	8,00%	11	22,00%	
BAT25	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,010
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT26	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,010
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT40	48	100,00%	26	54,17%	22	45,83%	0,041
MSI	22	45,83%	8	16,67%	14	29,17%	
MSS <sup>3</sup>	26	54,17%	18	37,50%	8	16,67%	
APC d5s346	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,095
MSI	20	40,00%	7	14,00%	13	26,00%	
MSS	17	34,00%	11	22,00%	6	12,00%	
LOH	13	26,00%	9	18,00%	4	8,00%	
d18s61	49	100,00%	26	53,06%	23	46,94%	0,008
MSI	18	36,73%	6	12,24%	12	24,49%	
MSS	11	22,45%	4	8,16%	7	14,29%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
LOH	18	36,73%	15	30,61%	3	6,12%	
mycl1	47	100,00%	26	55,32%	21	44,68%	0,054
MSI	20	42,55%	8	17,02%	12	25,53%	
MSS	20	42,55%	14	29,79%	6	12,77%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,26%	0	0,00%	2	4,26%	
LOH	5	10,64%	4	8,51%	1	2,13%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,085
ja	29	58,00%	19	38,00%	10	20,00%	
nein	21	42,00%	8	16,00%	13	26,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,005
ja	22	44,00%	17	34,00%	5	10,00%	
nein	28	56,00%	10	20,00%	18	36,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,001
ja	19	38,00%	16	32,00%	3	6,00%	
nein	31	62,00%	11	22,00%	20	40,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	27	54,00%	23	46,00%	0,010
ja	14	28,00%	12	24,00%	2	4,00%	
nein	36	72,00%	15	30,00%	21	42,00%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	19	55,88%	15	44,12%	0,017
ja	15	44,12%	12	35,29%	3	8,82%	
nein	19	55,88%	7	20,59%	12	35,29%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	19	55,88%	15	44,12%	0,013
ja	20	58,82%	15	44,12%	5	14,71%	
nein	14	41,18%	4	11,76%	10	29,41%	
<sup>1</sup> CEP3MWert>1xSD; <sup>2</sup> 9p21-LOH(%Zellen>4x%NG)							
<sup>3</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar							

Tab.33: CEP3 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP3-Alt.	keine CEP3-Alt.			
	n	%	n	%	n	%	p
MS-Status	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,004
MSS	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MS-Status	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,008
MSS	19	38,00%	14	28,00%	5	10,00%	
MSI-high	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSI-low	9	18,00%	6	12,00%	3	6,00%	
9p21-LOH <sup>2</sup>	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,005
ja	35	70,00%	23	46,00%	12	24,00%	
nein	15	30,00%	3	6,00%	12	24,00%	
BAT25	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,004
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT26	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,004
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT40	48	100,00%	25	52,08%	23	47,92%	0,019
MSI	22	45,83%	7	14,58%	15	31,25%	
MSS <sup>3</sup>	26	54,17%	18	37,50%	8	16,67%	
APC d5s346	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,045
MSI	20	40,00%	6	12,00%	14	28,00%	
MSS	17	34,00%	11	22,00%	6	12,00%	
LOH	13	26,00%	9	18,00%	4	8,00%	
d18s61	49	100,00%	25	51,02%	24	48,98%	0,024
MSI	18	36,73%	6	12,24%	12	24,49%	
MSS	11	22,45%	4	8,16%	7	14,29%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
LOH	18	36,73%	14	28,57%	4	8,16%	
mycl1	47	100,00%	25	53,19%	22	46,81%	0,033
MSI	20	42,55%	7	14,89%	13	27,66%	
MSS	20	42,55%	14	29,79%	6	12,77%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,26%	0	0,00%	2	4,26%	
LOH	5	10,64%	4	8,51%	1	2,13%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,151
ja	29	58,00%	18	36,00%	11	22,00%	
nein	21	42,00%	8	16,00%	13	26,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,002
ja	22	44,00%	17	34,00%	5	10,00%	
nein	28	56,00%	9	18,00%	10	20,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,000
ja	19	38,00%	16	32,00%	3	6,00%	
nein	31	62,00%	10	20,00%	21	42,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	26	52,00%	24	48,00%	0,004
ja	14	28,00%	12	24,00%	2	4,00%	
nein	36	72,00%	14	28,00%	22	44,00%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	18	52,94%	16	47,06%	0,007
ja	15	44,12%	12	35,29%	3	8,82%	
nein	19	55,88%	6	17,65%	13	38,24%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	18	52,94%	16	47,06%	0,004
ja	20	58,82%	15	44,12%	5	14,71%	
nein	14	41,18%	3	8,82%	11	32,35%	
<sup>1</sup> CEP3%Zellen>4x%NG; <sup>2</sup> 9p21-LOH(%Zellen>4x%NG)							
<sup>3</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar							

Tab.34: CEP7 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP7-Alt.		keine CEP7-Alt.		
	n	%	n	%	n	%	p
Grading	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,151
G2	26	52,00%	18	36,00%	8	16,00%	
G3	24	48,00%	11	22,00%	13	26,00%	
MS-Status	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,000
MSS	28	56,00%	23	46,00%	5	10,00%	
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MS-Status	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,000
MSS	19	38,00%	14	28,00%	5	10,00%	
MSI-high	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSI-low	9	18,00%	9	18,00%	0	0,00%	
BAT25	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,000
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	23	46,00%	5	10,00%	
BAT26	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,000
MSI	22	44,00%	6	12,00%	16	32,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	23	46,00%	5	10,00%	
BAT40	48	100,00%	27	56,25%	21	43,75%	0,000
MSI	22	45,83%	6	12,50%	16	33,33%	
MSS <sup>2</sup>	26	54,17%	21	43,75%	5	10,42%	
APC d5s346	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,001
MSI	20	40,00%	5	10,00%	15	30,00%	
MSS	17	34,00%	13	26,00%	4	8,00%	
LOH	13	26,00%	11	22,00%	2	4,00%	
d2s123	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,006
MSI	20	40,00%	6	12,00%	14	28,00%	
MSS	21	42,00%	15	30,00%	6	12,00%	
MSS <sup>2</sup>	7	14,00%	6	12,00%	1	2,00%	
LOH	2	4,00%	2	4,00%	0	0,00%	
d18s61	49	100,00%	28	57,14%	21	42,86%	0,003
MSI	18	36,73%	5	10,20%	13	26,53%	
MSS	11	22,45%	6	12,24%	5	10,20%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,08%	2	4,08%	0	0,00%	
LOH	18	36,73%	15	30,61%	3	6,12%	
mfd15	43	100,00%	24	55,81%	19	44,19%	0,05
MSI	18	41,86%	6	13,95%	12	27,91%	
MSS	18	41,86%	12	27,91%	6	13,95%	
MSS <sup>2</sup>	4	9,30%	3	6,98%	1	2,33%	
LOH	3	6,98%	3	6,98%	0	0,00%	
d18s58	45	100,00%	26	57,78%	19	42,22%	0,003
MSI	17	37,78%	5	11,11%	12	26,67%	
MSS	10	22,22%	5	11,11%	5	11,11%	
MSS <sup>2</sup>	6	13,33%	5	11,11%	1	2,22%	
LOH	12	26,67%	11	24,44%	1	2,22%	
d13s153	48	100,00%	27	56,25%	21	43,75%	0,007
MSI	18	37,50%	5	10,42%	13	27,08%	
MSS	25	52,08%	18	37,50%	7	14,58%	
LOH	5	10,42%	4	8,33%	1	2,08%	
mycl1	47	100,00%	26	55,32%	21	44,68%	0,018
MSI	20	42,55%	6	12,77%	14	29,79%	
MSS	20	42,55%	14	29,79%	6	12,77%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,26%	2	4,26%	0	0,00%	
LOH	5	10,64%	4	8,51%	1	2,13%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,021
ja	29	58,00%	21	42,00%	8	16,00%	
nein	21	42,00%	8	16,00%	13	26,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,004
ja	22	44,00%	18	36,00%	4	8,00%	
nein	28	56,00%	11	22,00%	17	34,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,000
ja	19	38,00%	17	34,00%	2	4,00%	
nein	31	62,00%	12	24,00%	19	38,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	29	58,00%	21	42,00%	0,003
ja	14	28,00%	13	26,00%	1	2,00%	
nein	36	72,00%	16	32,00%	20	40,00%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	21	58,33%	15	41,67%	0,019
ja	9	25,00%	2	5,56%	7	19,44%	
nein	27	75,00%	19	52,78%	8	22,22%	
MLH1-IH	44	100,00%	25	56,82%	19	43,18%	0,002
pos	28	63,64%	21	47,73%	7	15,91%	
neg	16	36,36%	4	9,09%	12	27,27%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	18	52,94%	16	47,06%	0,007
ja	15	44,12%	12	35,29%	3	8,82%	
nein	19	55,88%	6	17,65%	13	38,24%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	18	52,94%	16	47,06%	0,000
ja	20	58,82%	16	47,06%	4	11,76%	
nein	14	41,18%	2	5,88%	12	35,29%	
<sup>1</sup> CEP7MWert>1xSD							
<sup>2</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar							

Tab.35: CEP7 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP7-Alt.		keine CEP7-Alt.		p
	n	%	n	%	n	%	
Grading	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,077
G2	26	52,00%	20	40,00%	6	12,00%	
G3	24	48,00%	12	24,00%	12	24,00%	
MS-Status	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,000
MSS	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
MSI	22	44,00%	8	16,00%	14	28,00%	
MS-Status	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,001
MSS	19	38,00%	15	30,00%	4	8,00%	
MSI-high	22	44,00%	8	16,00%	14	28,00%	
MSI-low	9	18,00%	9	18,00%	0	0,00%	
BAT25	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,000
MSI	22	44,00%	8	16,00%	14	28,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
BAT26	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,000
MSI	22	44,00%	8	16,00%	14	28,00%	
MSS <sup>2</sup>	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
BAT40	48	100,00%	30	62,50%	18	37,50%	0,001
MSI	22	45,83%	8	16,67%	14	29,17%	
MSS <sup>2</sup>	26	54,17%	22	45,83%	4	8,33%	
APC d5s346	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,000
MSI	20	40,00%	6	12,00%	14	28,00%	
MSS	17	34,00%	14	28,00%	3	6,00%	
LOH	13	26,00%	12	24,00%	1	2,00%	
d2s123	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,032
MSI	20	40,00%	8	16,00%	12	24,00%	
MSS	21	42,00%	16	32,00%	5	10,00%	
MSS <sup>2</sup>	7	14,00%	6	12,00%	1	2,00%	
LOH	2	4,00%	2	4,00%	0	0,00%	
d18s61	49	100,00%	31	63,27%	18	36,73%	0,002
MSI	18	36,73%	6	12,24%	12	24,49%	
MSS	11	22,45%	7	14,29%	4	8,16%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,08%	2	4,08%	0	0,00%	
LOH	18	36,73%	16	32,65%	2	4,08%	
mfd15	43	100,00%	27	62,79%	16	37,21%	0,167
MSI	18	41,86%	8	18,60%	10	23,26%	
MSS	18	41,86%	13	30,23%	5	11,63%	
MSS <sup>2</sup>	4	9,30%	3	6,98%	1	2,33%	
LOH	3	6,98%	3	6,98%	0	0,00%	
d18s58	45	100,00%	29	64,44%	16	35,56%	0,002
MSI	17	37,78%	7	15,56%	10	22,22%	
MSS	10	22,22%	5	11,11%	5	11,11%	
MSS <sup>2</sup>	6	13,33%	5	11,11%	1	2,22%	
LOH	12	26,67%	12	26,67%	0	0,00%	
d13s153	48	100,00%	30	62,50%	18	37,50%	0,031
MSI	18	37,50%	7	14,58%	11	22,92%	
MSS	25	52,08%	19	39,58%	6	12,50%	
LOH	5	10,42%	4	8,33%	1	2,08%	
mycl1	47	100,00%	29	61,70%	18	38,30%	0,027
MSI	20	42,55%	8	17,02%	12	25,53%	
MSS	20	42,55%	14	29,79%	6	12,77%	
MSS <sup>2</sup>	2	4,26%	2	4,26%	0	0,00%	
LOH	5	10,64%	5	10,64%	0	0,00%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,016
ja	29	58,00%	23	46,00%	6	12,00%	
nein	21	42,00%	9	18,00%	12	24,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,007
ja	22	44,00%	19	38,00%	3	6,00%	
nein	28	56,00%	13	26,00%	15	30,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,001
ja	19	38,00%	18	36,00%	1	2,00%	
nein	31	62,00%	14	28,00%	17	34,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	32	64,00%	18	36,00%	0,009
ja	14	28,00%	13	26,00%	1	2,00%	
nein	36	72,00%	19	38,00%	17	34,00%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	23	63,89%	13	36,11%	0,046
ja	9	25,00%	3	8,33%	6	16,67%	
nein	27	75,00%	20	55,56%	7	19,44%	
MLH1-IH	44	100,00%	28	63,64%	16	36,36%	0,010
pos	28	63,64%	22	50,00%	6	13,64%	
neg	16	36,36%	6	13,64%	10	22,73%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	21	61,76%	13	38,24%	0,013
ja	15	44,12%	13	38,24%	2	5,88%	
nein	19	55,88%	8	23,53%	11	32,35%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	21	61,76%	13	38,24%	0,001
ja	20	58,82%	17	50,00%	3	8,82%	
nein	14	41,18%	4	11,76%	10	29,41%	

<sup>1</sup>CEP7%Zellen>4x%NG<sup>2</sup>MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar



Tab.36: CEP17 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP17-Alt.		keine CEP17-Alt.		p
	n	%	n	%	n	%	
Tu-Lokalisation	49	100,00%	23	46,94%	26	53,06%	1,000
proximal	24	48,98%	11	22,45%	13	26,53%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	11	22,45%	12	24,49%	
Grading	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,413
G2	26	52,00%	14	28,00%	12	24,00%	
G3	24	48,00%	10	20,00%	14	28,00%	
MS-Status	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,000
MSS	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
MSI	22	44,00%	4	8,00%	18	36,00%	
MS-Status	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,001
MSS	19	38,00%	13	26,00%	6	12,00%	
MSI-high	22	44,00%	4	8,00%	18	36,00%	
MSI-low	9	18,00%	7	14,00%	2	4,00%	
9p21-LOH <sup>2</sup>	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,014
ja	35	70,00%	21	42,00%	14	28,00%	
nein	15	30,00%	3	6,00%	12	24,00%	
BAT25	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,000
MSI	22	44,00%	4	8,00%	18	36,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT26	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,000
MSI	22	44,00%	4	8,00%	18	36,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	20	40,00%	8	16,00%	
BAT40	48	100,00%	23	47,92%	25	52,08%	0,002
MSI	22	45,83%	5	10,42%	17	35,42%	
MSS <sup>3</sup>	26	54,17%	18	37,50%	8	16,67%	
APC d5s346	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,000
MSI	20	40,00%	3	6,00%	17	34,00%	
MSS	17	34,00%	11	22,00%	6	12,00%	
LOH	13	26,00%	10	20,00%	3	6,00%	
APC d5s1720	47	100,00%	24	51,06%	23	48,94%	0,135
MSI	16	34,04%	5	10,64%	11	23,40%	
MSS	11	23,40%	5	10,64%	6	12,77%	
MSS <sup>3</sup>	6	12,77%	4	8,51%	2	4,26%	
LOH	14	29,79%	10	21,28%	4	8,51%	
d2s123	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,020
MSI	20	40,00%	5	10,00%	15	30,00%	
MSS	21	42,00%	12	24,00%	9	18,00%	
MSS <sup>3</sup>	7	14,00%	6	12,00%	1	2,00%	
LOH	2	4,00%	1	2,00%	1	2,00%	
d18s61	49	100,00%	23	46,94%	26	53,06%	0,000
MSI	18	36,73%	2	4,08%	16	32,65%	
MSS	11	22,45%	6	12,24%	5	10,20%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
LOH	18	36,73%	14	28,57%	4	8,16%	
d18s58	45	100,00%	22	48,89%	23	51,11%	0,034
MSI	17	37,78%	5	11,11%	12	26,67%	
MSS	10	22,22%	4	8,89%	6	13,33%	
MSS <sup>3</sup>	6	13,33%	3	6,67%	3	6,67%	
LOH	12	26,67%	10	22,22%	2	4,44%	
d13s153	48	100,00%	23	47,92%	25	52,08%	0,018
MSI	18	37,50%	4	8,33%	14	29,17%	
MSS	25	52,08%	16	33,33%	9	18,75%	
LOH	5	10,42%	3	6,25%	2	4,17%	
mycl1	47	100,00%	23	48,94%	24	51,06%	0,020
MSI	20	42,55%	5	10,64%	15	31,91%	
MSS	20	42,55%	13	27,66%	7	14,89%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,26%	1	2,13%	1	2,13%	
LOH	5	10,64%	4	8,51%	1	2,13%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,001
ja	29	58,00%	20	40,00%	9	18,00%	
nein	21	42,00%	4	8,00%	17	34,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,004
ja	22	44,00%	16	32,00%	6	12,00%	
nein	28	56,00%	8	16,00%	20	40,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,001
ja	19	38,00%	15	30,00%	22	44,00%	
nein	31	62,00%	9	18,00%	4	8,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	24	48,00%	26	52,00%	0,011
ja	14	28,00%	11	22,00%	3	6,00%	
nein	36	72,00%	13	26,00%	23	46,00%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	17	47,22%	19	52,78%	0,020
ja	9	25,00%	1	2,78%	8	22,22%	
nein	27	75,00%	16	44,44%	11	30,56%	
MLH1-IH	44	100,00%	21	47,73%	23	52,27%	0,005
pos	28	63,64%	18	40,91%	10	22,73%	
neg	16	36,36%	3	6,82%	13	29,55%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	17	50,00%	17	50,00%	0,037
ja	15	44,12%	11	32,35%	4	11,76%	
nein	19	55,88%	6	17,65%	13	38,24%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	17	50,00%	17	50,00%	0,013
ja	20	58,82%	14	41,18%	6	17,65%	
nein	14	41,18%	3	8,82%	11	32,35%	

<sup>1</sup>CEP17MWert>1xSD;<sup>2</sup>9p21-LOH(%Zellen>4x%NG)<sup>3</sup>MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar

Tab.37: CEP17 <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		CEP17-Alt.		keine CEP17-Alt.		p
	n	%	n	%	n	%	
Tu-Lokalisation	49	100,00%	30	61,22%	19	38,78%	0,531
proximal	24	48,98%	13	26,53%	11	22,45%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	16	32,65%	7	14,29%	
Grading	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,145
G2	26	52,00%	19	38,00%	7	14,00%	
G3	24	48,00%	12	24,00%	12	24,00%	
MS-Status	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
MSS	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MS-Status	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
MSS	19	38,00%	17	34,00%	2	4,00%	
MSI-high	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSI-low	9	18,00%	7	14,00%	2	4,00%	
9p21-LOH <sup>2</sup>	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,056
ja	35	70,00%	25	50,00%	10	20,00%	
nein	15	30,00%	6	12,00%	9	18,00%	
BAT25	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
BAT26	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
MSI	22	44,00%	7	14,00%	15	30,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	24	48,00%	4	8,00%	
BAT40	48	100,00%	29	60,42%	19	39,58%	0,000
MSI	22	45,83%	7	14,58%	15	31,25%	
MSS <sup>3</sup>	26	54,17%	22	45,83%	4	8,33%	
APC d5s346	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
MSI	20	40,00%	6	12,00%	14	28,00%	
MSS	17	34,00%	13	26,00%	4	8,00%	
LOH	13	26,00%	12	24,00%	1	2,00%	
APC d5s1720	47	100,00%	29	61,70%	18	38,30%	0,031
MSI	16	34,04%	6	12,77%	10	21,28%	
MSS	11	23,40%	6	12,77%	5	10,64%	
MSS <sup>3</sup>	6	12,77%	5	10,64%	1	2,13%	
LOH	14	29,79%	12	25,53%	2	4,26%	
d2s123	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,012
MSI	20	40,00%	8	16,00%	12	24,00%	
MSS	21	42,00%	15	30,00%	6	12,00%	
MSS <sup>3</sup>	7	14,00%	7	14,00%	0	0,00%	
LOH	2	4,00%	1	2,00%	1	2,00%	
d18s61	49	100,00%	30	61,22%	19	38,78%	0,002
MSI	18	36,73%	5	10,20%	13	26,53%	
MSS	11	22,45%	8	16,33%	3	6,12%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,08%	2	4,08%	0	0,00%	
LOH	18	36,73%	15	30,61%	3	6,12%	
d18s58	45	100,00%	27	60,00%	18	40,00%	0,058
MSI	17	37,78%	6	13,33%	11	24,44%	
MSS	10	22,22%	7	15,56%	3	6,67%	
MSS <sup>3</sup>	6	13,33%	4	8,89%	2	4,44%	
LOH	12	26,67%	10	22,22%	2	4,44%	
d13s153	48	100,00%	29	60,42%	19	39,58%	0,001
MSI	18	37,50%	5	10,42%	13	27,08%	
MSS	25	52,08%	20	41,67%	5	10,42%	
LOH	5	10,42%	4	8,33%	1	2,08%	
mycl1	47	100,00%	29	61,70%	18	38,30%	0,003
MSI	20	42,55%	7	14,89%	13	27,66%	
MSS	20	42,55%	16	34,04%	4	8,51%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,26%	1	2,13%	1	2,13%	
LOH	5	10,64%	5	10,64%	0	0,00%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,000
ja	29	58,00%	25	50,00%	4	8,00%	
nein	21	42,00%	6	12,00%	15	30,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,003
ja	22	44,00%	19	38,00%	3	6,00%	
nein	28	56,00%	12	24,00%	16	32,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,002
ja	19	38,00%	17	34,00%	2	4,00%	
nein	31	62,00%	14	28,00%	17	34,00%	
LOH>=40% der Marker	50	100,00%	31	62,00%	19	38,00%	0,050
ja	14	28,00%	12	24,00%	2	4,00%	
nein	36	72,00%	19	38,00%	17	34,00%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	22	61,11%	14	38,89%	0,014
ja	9	25,00%	2	5,56%	7	19,44%	
nein	27	75,00%	20	55,56%	7	19,44%	
MLH1-IH	44	100,00%	27	61,36%	17	38,64%	0,003
pos	28	63,64%	22	50,00%	6	13,64%	
neg	16	36,36%	5	11,36%	11	25,00%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	20	58,82%	14	41,18%	0,171
ja	15	44,12%	11	32,35%	4	11,76%	
nein	19	55,88%	9	26,47%	10	29,41%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	20	58,82%	14	41,18%	0,035
ja	20	58,82%	15	44,12%	5	14,71%	
nein	14	41,18%	5	14,71%	9	26,47%	

<sup>1</sup>CEP17%Zellen>4x%NG;<sup>2</sup>9p21-LOH(%Zellen>4x%NG)<sup>3</sup>MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar

Tab.38: p16(9p21)-Alteration <sup>1</sup> in Korrelation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern							
	Tu ges.		9p21-Alt.	keine 9p21-Alt.			
	n	%	n	%	n	%	p
Tu-Lokalisation	49	100,00%	14	28,57%	35	71,43%	0,180
proximal	24	48,98%	4	8,16%	20	40,82%	
C. transversum	2	4,08%	1	2,04%	1	2,04%	
distal	23	46,94%	9	18,37%	14	28,57%	
Grading	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,352
G2	26	52,00%	9	18,00%	17	34,00%	
G3	24	48,00%	5	10,00%	19	38,00%	
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,011
MSS	28	56,00%	12	24,00%	16	32,00%	
MSI	22	44,00%	2	4,00%	20	40,00%	
MS-Status	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,015
MSS	19	38,00%	7	14,00%	12	24,00%	
MSI-high	22	44,00%	2	4,00%	20	40,00%	
MSI-low	9	18,00%	5	10,00%	4	8,00%	
9p21-LOH <sup>2</sup>	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,004
ja	35	70,00%	14	28,00%	21	42,00%	
nein	15	30,00%	0	0,00%	15	30,00%	
BAT25	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,011
MSI	22	44,00%	2	4,00%	20	40,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	12	24,00%	16	32,00%	
BAT26	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,011
MSI	22	44,00%	2	4,00%	20	40,00%	
MSS <sup>3</sup>	28	56,00%	12	24,00%	16	32,00%	
BAT40	48	100,00%	14	29,17%	34	70,83%	0,054
MSI	22	45,83%	3	6,25%	19	39,58%	
MSS <sup>3</sup>	26	54,17%	11	22,92%	15	31,25%	
APC d5s346	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,039
MSI	20	40,00%	2	4,00%	18	36,00%	
MSS	17	34,00%	8	16,00%	9	18,00%	
LOH	13	26,00%	4	8,00%	9	18,00%	
d18s61	49	100,00%	13	26,53%	36	73,47%	0,013
MSI	18	36,73%	1	2,04%	17	34,69%	
MSS	11	22,45%	3	6,12%	8	16,33%	
MSS <sup>3</sup>	2	4,08%	0	0,00%	2	4,08%	
LOH	18	36,73%	9	18,37%	9	18,37%	
LOH>=10% der Marker	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,024
ja	29	58,00%	12	24,00%	17	34,00%	
nein	21	42,00%	2	4,00%	19	38,00%	
LOH>=20% der Marker	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,025
ja	22	44,00%	10	20,00%	12	24,00%	
nein	28	56,00%	4	8,00%	24	48,00%	
LOH>=30% der Marker	50	100,00%	14	28,00%	36	72,00%	0,025
ja	19	38,00%	9	18,00%	10	20,00%	
nein	31	62,00%	5	10,00%	26	52,00%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	10	27,78%	26	72,22%	0,039
ja	9	25,00%	0	0,00%	9	25,00%	
nein	27	75,00%	10	27,78%	17	47,22%	
MLH1-IH	44	100,00%	12	27,27%	32	72,73%	0,032
pos	28	63,64%	11	25,00%	17	38,64%	
neg	16	36,36%	1	2,27%	15	34,09%	
<sup>1</sup> p16(9p21)MWert>1xSD; <sup>2</sup> 9p21-LOH(%Zellen>4x%NG)							
<sup>3</sup> MSS, aber nicht informativ, da nur 1 Allel auswertbar							

## 6. Anhang

Tab.41: MS-Status <sup>1</sup> in Korrelation zu molekularen Parametern									
	Tu ges.		MSS Tu		MSI-low Tu		MSI-high Tu		
	n	%	n	%	n	%	n	%	p
p14-Methylierung	36	100,00%	12	33,33%	8	22,22%	16	44,44%	0,272
ja	11	30,56%	3	8,33%	1	2,78%	7	19,44%	
nein	25	69,44%	9	25,00%	7	19,44%	9	25,00%	
p15-Methylierung	36	100,00%	12	33,33%	8	22,22%	16	44,44%	0,832
ja	5	13,89%	1	2,78%	1	2,78%	3	8,33%	
nein	31	86,11%	11	30,56%	7	19,44%	13	36,11%	
p16-Methylierung	36	100,00%	12	33,33%	8	22,22%	16	44,44%	0,039
ja	10	27,78%	1	2,78%	1	2,78%	8	22,22%	
nein	26	72,22%	11	30,56%	7	19,44%	8	22,22%	
MLH1-Methylierung	36	100,00%	12	33,33%	8	22,22%	16	44,44%	0,000
ja	9	25,00%	0	0,00%	0	0,00%	9	25,00%	
nein	27	75,00%	12	33,33%	8	22,22%	7	19,44%	
MLH1-IH	44	100,00%	15	34,09%	8	18,18%	21	47,73%	0,000
pos	28	63,64%	15	34,09%	8	18,18%	5	11,36%	
neg	16	36,36%	0	0,00%	0	0,00%	16	36,36%	
MSH2-IH	45	100,00%	16	35,56%	8	17,78%	21	46,67%	0,661
pos	43	95,56%	16	35,56%	8	17,78%	19	42,22%	
neg	2	4,44%	0	0,00%	0	0,00%	2	4,44%	
MSH6-IH	44	100,00%	16	36,36%	8	18,18%	20	45,45%	0,295
pos	40	90,91%	16	36,36%	7	15,91%	17	38,64%	
neg	4	9,09%	0	0,00%	1	2,27%	3	6,82%	
CIMP-Pathway	36	100,00%	12	33,33%	8	22,22%	16	44,44%	0,039
ja	10	27,78%	1	2,78%	1	2,78%	8	22,22%	
nein	26	72,22%	11	30,56%	7	19,44%	8	22,22%	
Maspin-IH	39	100,00%	13	33,33%	8	20,51%	18	46,15%	1,000
Expr>10%	37	94,87%	12	30,77%	8	20,51%	17	43,59%	
Expr<10%	2	5,13%	1	2,56%	0	0,00%	1	2,56%	
β-catenin (Kern-Expression 1%)	34	100,00%	11	32,35%	6	17,65%	17	50,00%	0,005
ja	15	44,12%	7	20,59%	5	14,71%	3	8,82%	
nein	19	55,88%	4	11,76%	1	2,94%	14	41,18%	
β-catenin (Kern-Expression 2%)	34	100,00%	11	32,35%	6	17,65%	17	50,00%	0,014
ja	5	14,71%	4	11,76%	1	2,94%	0	0,00%	
nein	29	85,29%	7	20,59%	5	14,71%	17	50,00%	
β-catenin (Kern-Expression > 70%)	34	100,00%	11	32,35%	6	17,65%	17	50,00%	0,014
ja	5	14,71%	4	11,76%	1	2,94%	0	0,00%	
nein	29	85,29%	7	20,59%	5	14,71%	17	50,00%	
β-catenin (Kern-Expression>=10%)	34	100,00%	11	32,35%	6	17,65%	17	50,00%	0,000
ja	20	58,82%	11	32,35%	6	17,65%	3	8,82%	
nein	14	41,18%	0	0,00%	0	0,00%	14	41,18%	
<sup>1</sup> MSS: keine Mikrosatelliteninstabilität (0/13 Markern), MSI-low: Mikrosatelliteninstabilität auf 1/13 oder 2/13 Markern,									
MSI-high: Mikrosatelliteninstabilität > 2/13 Markern									

Tab. 42: Übersicht der klinisch-pathologischen und molekulare Parameter bei den 50 Einzelfällen																							
ID	Tu-Stadium (T1-T4)	N-Status (N0-N2)	Tu-Lokalisation	Grading (G2-G3)	Alter (bei OP)	Geschlecht (m/w)	Überleben	M5-Status	CEP+MWert>1xSD	CIN-Status	%ZellenCEP+>4%NG	CIN-Status	p16(9p21)-LOH %ZellenLOH>4%NG	p14-Meth.	p15-Meth.	p16-Meth.	MLH1-Meth.	MLH1-IH	MSH2-IH	MSH6-IH	CIMP	Maspin-IH Expr. >=10% Expr. >=10%	β-catenin
1	3	1 (1/42)	C. ascendens	2	73	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	nb
2	4	0 (0/31)	C. ascendens	3	65	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
3	3	0 (0/25)	C. transversum	2	61	m	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	negativ
4	2	0 (0/30)	C. ascendens	2	71	m	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
5	3	0 (0/13)	C. ascendens	3	46	m	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	negativ	positiv	positiv	nb	positiv	negativ
6	3	1 (1/17)	C. ascendens	3	80	m	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ
7	3	2 (5/22)	Caecum	3	34	m	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	negativ	positiv	positiv	nb	positiv	negativ
8	4	2 (4/15)	Rektum	3	82	m	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
9	3	0 (0/25)	Caecum	3	77	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
10	3	0 (0/40)	C. descendens	3	50	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ
11	3	1 (1/18)	Rektum	2	38	m	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ
12	3	0 (0/10)	Caecum	3	73	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
13	3	0 (0/13)	C. ascendens	2	64	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
14	3	1 (1/23)	C. ascendens	3	54	m	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+positiv	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
15	4	2 (16/17)	Caecum	3	83	w	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ
16	2	0 (0/24)	Caecum	2	56	m	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
17	2	0 (0/15)	C. ascendens	3	80	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
18	2	0 (0/15)	Rektum	2	56	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	negativ
19	3	0 (0/15)	C. ascendens	2	63	m	verstorben	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv
20	2	1 (2/45)	Coecum	2	63	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
21	3	0 (0/27)	C. ascendens	2	56	m	lebt	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
22	1	0 (0/22)	Sigma	2	68	m	lebt	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	nb
23	3	2 (15/19)	C. descendens	2	52	w	verstorben	M5I-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
24	3	0 (0/34)	Sigma	2	50	w	lebt	M5I-low	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
25	2	1 (2/8)	Sigma	2	69	m	lebt	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
26	1	0 (0/14)	Rektum	2	62	m	verstorben	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
27	1	1 (1/17)	Rektum	2	67	w	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	nb
28	3	2 (4/20)	Rektum	2	27	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
29	4	2 (15/30)	C. ascendens	3	49	m	verstorben	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
30	3	1 (1/16)	Sigma	2	36	m	lebt	M5I-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	nb
31	2	0 (0/31)	Caecum	3	41	w	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
32	3	2 (6/15)	Rektum	3	82	w	verstorben	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
33	3	2 (11/19)	Rektum	3	77	m	verstorben	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	positiv	nb	positiv	positiv
34	4	0 (0/26)	C. ascendens	3	64	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
35	4	2 (13/21)	C. asc.+Sig.+Rekt	3	78	m	verstorben	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
36	4	2 (29/39)	Sigma	2	59	m	verstorben	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
37	3	0 (0/12)	Rektum	3	86	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
38	3	0 (0/15)	C.	3	65	m	lebt	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
39	4	2 (4/9)	Sigma	2	72	w	verstorben	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
40	4	1 (2/27)	Caecum	3	53	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
41	2	0 (0/20)	Caecum	3	65	w	lebt	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-low	CIN-low	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	negativ	positiv	positiv	nb	nb	nb
42	3	0 (0/24)	rechte Flexur	3	70	m	lebt	M5I-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	positiv	nb	nb	nb
43	4	2 (6/17)	C. descendens	3	86	w	verstorben	M5I-high	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	negativ	positiv	positiv	nb	nb	nb
44	3	2 (21/21)	Rektum	2	58	m	verstorben	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
45	4	2 (13/16)	Sigma	2	55	m	verstorben	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
46	nb	nb	Sigma(+Ovar)	3	89	w	verstorben	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	positiv	nb	nb	nb
47	3	0 (0/30)	Rektum	2	68	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	positiv	nb	nb	nb
48	3	0 (0/15)	C. transversum	2	54	m	lebt	M5S	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	positiv	nb	nb	nb
49	2	0 (0/8)	Rektum	2	76	w	lebt	M5S	CIN-low	CIN-low	CIN-high	CIN-high	LOH+negativ	nb	nb	nb	nb	nb	positiv	positiv	nb	nb	nb
50	3	0 (0/5)	rechte Flexur	2	63	w	lebt	M5I-low	CIN-high	CIN-high	CIN-high	CIN-high	LOH+positiv	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
nicht bekannt																							

nb: nicht bekannt

## **7. Literaturverzeichnis**

Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Peterson GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-816.

Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, Baylin SB, Issa JP: Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997;57:3370-3374.

Aquilina G, Hess P, Branch P, MacGeoch C, Casciano I, Karran P, Bignami M: A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8905-8909.

Arnold CN, Goel A, Compton C, Marcus V, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Inoue T, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter hypermethylation in defining the MSI phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004; 3:73-8.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Baker DF, Nakamura Y et al.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-221.

Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Lindström C, Törnqvist A, Frederiksen H, Andrén-Sandberg Å, Mitelman F, Heim S: Cytogenetic analyses of 52 colorectal carcinomas- non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameters. *Int J Cancer* 1993; 55:422-428.

Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Grabowski M, Keller G, Holinski-Feder E, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W: Distinction of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3221-3228.

Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Vogel C, Kurz K, Morak M, Keller G, Holinski-Feder E, Hofstaedter F, Dietmaier W: MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest* 2008; 88:1367-1375.

Bettstetter M, Rümmele P, Hofstädter F, Dietmaier W: A new quantitative DNA-methylation analysis of MSI colorectal cancers helps to separate sporadic colorectal cancers from HNPCC-candidates. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2006; 90:236-243.

Biden KG, Simms LA, Cummings M, Buttenshaw R, Schoch E, Searle J, Gobe G, Jass JR, Meltzer S, Leggett BA, Young J: Expression of Bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 17:1254-1249.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD: A homologue of drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998; 17:3052-3065.

Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, Oberg AL, Kabat BF, Slusser JP, Wang L, Morlan BW, French AJ, Smyrk TC, Lindor NM, Thibodeau SN: Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:2323-2328.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.

Boland CR: Understanding familial colorectal cancer- finding the corner pieces and filling in the center of the puzzle. *Gastroenterology* 2004; 127:334-343.

Bongaerts BW, de Goeij AF, de Vogel S, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Weijenberg MP: Alcohol consumption and distinct molecular pathways to colorectal cancer. *Br J Nutr* 2007; 97:430-434.

Boveri T (Hrsg): Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1914.

Cabrera CM, López-Nevot MA: APC and chromosome instability in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97:738-743.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-303.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C :Genetic instability and Darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999; 9:M57–60.

Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 1999; 21:103-107.

Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miro R: Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis* 2006; 27:419-428.

Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capella G, Egozcue J, Peinado MA, Miro R: Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int. J. Cancer* 2004; 110:869-874.

Chan TL, Curtis LC, Leung SY, Farrington SM, Ho JWC, Chan ASY, Lam PWY, Tse CW, Dunlop MG, Wyllie AH, Yuen ST: Early-onset colorectal cancer with stable microsatellite DNA and near-diploid chromosomes. *Oncogene* 2001; 20:4871-4876.

Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AFY, Chi CW: Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1721-1727.



Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Kim KM, Rhyu MG: Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2311-2322.

Cohn KH, Ornstein DL, Wang F, DeSoto LaPaix F, Phipps K, Edelsberg C, Zuna R, Mott LA, Dunn JL: The significance of allelic deletions and aneuploidie in colorectal carcinoma. Results of a 5-year follow-up study. *Cancer* 1997; 79:233-244.

Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Flejou JF, Iggo R, Thomas G, Hamelin R: Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 1996; 13:2727-2730.

Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 92(22):1177-1185.

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN: Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:3455-60.

Curtis LJ, Georgiades IB, White S, Bird CC, Harrison DJ, Wyllie AH: Specific patterns of chromosomal abnormalities are associated with RER status in sporadic colorectal cancer. *J Pathol* 2000; 192:440-445.

D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL: Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 2002; 21:6146-6153.

De Angelis PM, Clausen OPF, Schjølberg A, Stokke T: Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumor DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *British journal of cancer* 1999; 80:526-535.

Demetrick DJ: Fluorescence in Situ Hybridization and Human Cell Cycle Genes. In *Cell Cycle: Materials and Methods*. Zürich, Springer Verlag, 1995; pp.29-45.

Demetrick DJ: The use of archival frozen tumor tissue imprint specimens for Fluorescence in Situ Hybridization. *Mod Pathol* 1996; 9:133-136.

Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS: Methylation of hMLM1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86:574-579.

Devilee P, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AHN, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ: Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. *Cancer Res* 1988; 48:5825-5830.

Dietmaier W, Bettstetter M, Wild PJ, Woenckhaus M, Rümmele P, Hartmann A, Dechant S, Blaszyk H, Pauer A, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F: Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:2247-2254.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J: Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57:4749-4756.

Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M; Capozzi E, Vecchiato N, Macrì E, Fornasarig M, Boiocchi M: High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999; 154:1805-1813.

Donehower LA, Godley LA and Aldaz CM, Pyle R, Shi YP, Pinkel D, Gray J, Bradley A, Medina D, Varmus HE: Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability, *Genes Dev* 1995; 9:882–895.

Dutertre S, Descamps S, Prigent C: On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 2002; 21:6175-6183.

Duval A, Gayet J, Zhou XP, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R: Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59:4213-4215.

Duval A, Hamelin R: Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002; 62:2447-2454.

Duval A, Rolland S, Compoint A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R: Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Human Molecular Genetics* 2001; 10:513-518.

Eshleman JR, Casey G, Kochera ME, Sedwick WD, Swinler SE, Veigl ML, Willson JKV, Schwartz S, Markowitz SD: Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene* 1998; 17:719-725.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999; 59:793-797.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF: The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 721–733.

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247:49-56.

Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.

Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B, Nilbert M: Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2002; 2:25.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and the association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75:1027-1038.

Fishel R, Kolodner RD: Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:382-395.

Flenzel-Beyme R: Ist der vegetarische Lebensstil empfehlenswert für die Verringerung des Krebsrisikos und der Sterblichkeit am Herzinfarkt? *Dtsch Zschr Onkol* 1991; 23:145-154.

Flyger HL, Larsen JK, Nielsen HJ, Christensen IJ: DNA ploidy in colorectal cancer, heterogeneity within and between tumors and relation to survival. *Cytometry (Comm. Clin. Cytometry)* 1999; 38:293-300.

Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H: Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3:433-438.

Georgiades IB, Curtis LJ, Morris RM, Bird CC, Wyllie AH: Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 18:7933-7940.

Gerlach U, Kayser G, Walch A, Hopt U, Schulte-Mönting J, Werner M, Lassmann S: Centrosome-, chromosomal-passenger- and cell-cycle-associated mRNAs are differentially regulated in the development of sporadic colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 208:462-472.

Gervaz P, Bucher P, Morel P: Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol* 2004; 88:261-266.

Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schrock E, Neumann T, Jauho A, Auer G, Ried T: Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:183-190.

Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E, Pollack JR: A gene expression signature of genetic instability in colon cancer. *Cancer Res* 2005; 65:9200-9205.

Giaretti W, Rapallo A, Sciutto A, Macciocu B, Geido E, Hermesen MA, Postma C, , Baak JP, Williams RA, Meijer GA: Intratumor heterogeneity of k-ras and p53 mutations among human colorectal adenomas containing early cancer. *Anal Cell Pathol* 2000; 21:49-57.

Giovannucci E: Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control* 1995; 6:164-179.

Giovannucci E, Stampfer M, Colditz GA Rimm EB, Trichopoulos D., Rosner BA, Speizer FE, Willett WC.: Folate, methionine and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:875-884.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64:3014-3021.

Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63:1608-1614.

Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR: The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007; 132:127-38.

Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23:11-27.

Grady WM, Markowitz S: Genomic instability and colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol.* 2000; 16:62-67.

Greten H (Hrsg): Innere Medizin. 11. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2002; S. 787-793.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J, McPherson J, Wasmuth J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66:589-600.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite instability in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69-77.

Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J: Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21:233-300.

Guda K, Upender MB, Belinsky G, Flynn C, Nakanishi M, Marino JN, Ried T, Rosenberg DW: Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability. *Oncogene* 2004; 23:3813-3821.

Hadjihannas MV, Behrens J: CIN by WNT: growth pathways, mitotic control and chromosomal instability in cancer. *Cell Cycle* 2006; 5:2077-2081.

Hadjihannas MV, Bruckner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, Behrens J: Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:10747-52.

Hahn WC, Weinberg RA: Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-1603.

Halford S, Sasieni P, Rowan A, Wasan H, Bodmer W, Talbot I, Hawkins N, Ward R, Tomlinson I: Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* 2002; 62:53-57.

Halford SER, Sawyer EJ, Lambros MB, Gorman P, Macdonald ND, Talbot IC, Foulkes WD, Gillett CE, Barnes DM, Akslen LA, Lee K, Jacobs IJ, Hanby AM, Ganesan TS, Salvesen HB,

Bodmer WF, Tomlinson IPM, Roylance RR: MSI-low, a real phenomenon which varies in frequency among cancer types. *J Pathol* 2003; 201:389-394.

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Hansemann D (Hrsg): Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Berlin 1890; S. 299-326.

Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R: Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol.* 1999;154:721-727.

Hartwell L: Defects in cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992; 71:543-546.

Hartwell L, Weinert T, Kadyk L, Garvik B: Cell cycle checkpoints, genomic integrity and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59:259-263.

Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R: CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 2002; 122:1376-1387.

Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL: Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2001; 84:232-236.

Haydon AM, Jass JR: Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol* 2002; 3:83-88.

Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, Sandkuijl L, MØller P, Genuardi M, van Houwelingen H, Tops C, van Puijenbroek M, Verkuijlen P, Kenter G, van Mil A, Meijers- Heijboer H, Tan GB, Breuning MH, Fodde R, Wijnen JTH, Bröcker- Vriends AHJT, Vasen H: Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer

due to MSH6 mutations: impact on counselling and surveillance. *Gastroenterology* 2004; 127:17-25.

Herbergs J, Hopman AHN, de Bruine AP, Ramaekers FCS, Arends JM: In situ hybridization and flow cytometric analyses of colorectal tumors suggests two routes of tumourgenesis characterized by gain of chromosome 7 or loss of chromosomes 17 and 18. *Journal of Pathology* 1996; 179:243-247.

Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042-2054.

Herman J G, Merlo A, Mao L, Lapidus R G, Issa J P, Davidson N E, Sidransky D, Baylin S B: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995; 55:4525–4530.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:6870-6875.

Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A, Meijer G: Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002; 123: 1109-1119.

Hershko DD, Shapira M : Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107:668-675.

Hiddemann, Huber, Bartram (Hrsg): *Die Onkologie Teil 2* Springer Verlag, Berlin – Heidelberg - New York, 2004; S. 876-932.

Hopman AHN, van Hooren E, van de Kaa CA, Voojis PGP, Ramaekers FCS: Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridisation in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Modern Pathology* 1991b; 4:503-513.



Hopman AHN, Moesker O, Smeets AWGB, Pauwels RPE, Vooijs GP, Ramaekers FCS: Numerical chromosomes 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridisation. *Cancer Res* 1991a; 51:644-651.

Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JK, Markowitz SD, Morin P, Kinzler KW, Vogelstein B, Dunlop MG: APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9049-9054.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561.

Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB: Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994;7:536-540.

Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 2001; 105:445-457.

Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA: Characterization of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52:455-460.

Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML, Van de Water NS, Browett PJ: Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995; 346:1200-1201.

Jass JR, Young J, Leggett BA: Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. *J Gastroenterol Hepatol* 2002b; 17:17-26.

Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA: Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002a; 123:862-876.

Jass JR, Whitehall VLJ, Young J, Leggett B, Meltzer SJ, Matsubara N, Fishel R: Correspondence re: P. Laiho et al., Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 2002c; 62:1166-1170.

Jung B, Smith EJ, Doctolero RT, Gervaz P, Alonso JC, Miyai K, Keku T, Sandler RS, Carethers JM: Influence of target gene mutations on survival, stage and histology in sporadic microsatellite unstable colon cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:2509-2513.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW: ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:5321-5325.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264:436-440.

Kambara T, Simms LA, Withhall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA: BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53:1137-44.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57:808-811.

Katayama H, Brinkley WR, Sen S: The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22:451-464.

Kazama Y, Watanabe T, Kanazawa T, Tada T, Tanaka J, Nagawa H: Mucinous carcinomas of the colon and rectum show higher rates of microsatellite instability and lower rates of chromosomal instability. *Cancer* 2005; 103:2023-2029.

Kemp Z, Rowan A, Chambers W, Wortham N, Halford S, Sieber O, Mortensen N, von Herbay A, Gunther T, Ilyas M, Tomlinson I: CDC4 mutations occur in a subset of colorectal cancers but are not predicted to cause loss of function and are not associated with chromosomal instability. *Cancer Res* 2005; 65:11361-11366.

Kennedy EP, Hamilton SR: Genetics of colorectal cancer. *Semin Surg Oncol* 1998; 15:126-130.

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR: Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences: *Am J Pathol* 1994; 145:148-156.

Kim IJ, Kang HC, Park JH, Shin Y, Ku JL, Lim SB, Park SY, Jung SY, Kim HK, Park JG: Development and applications of a beta-catenin oligonucleotide microarray: beta-catenin mutations are dominantly found in the proximal colon cancers with microsatellite instability. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2920-2925.

Kim NG, Choi YR, Baek MJ, Kim YH, Kang H, Kim NK, Min JS, Kim H: Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61:36-38.

Kim NG, Hwanseok R, Li LS, Kim Hy, Lee JS, Kim JH, Kim NK, Kim Ho: Identification of MARCKS, FLJ11383 and TAF1B as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 2002; 21:5081-5087.

Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D et al.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253:661-665.

Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.

Kölble K, Barthel B, Ullrich O, Pidde H, Döhring C, Rüschhoff J, Schlag PM, Dietel M: beta-Catenine as a genomic target of high-grade microsatellite instability in colorectal cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000; 84:182-186.

Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, Dhillon VS, Trent RJ, Chapuis PH, Bokey EL: Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:2318-2324.

Kolodner RD, Putnam CD, Myung K: Maintenance of genome stability in *saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2002; 297:552-557.

Kondo Y, Issa JP: Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 29-39.

Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, Mecklin JP, Järvinen H, Sistonen P, Kim KM, Shibata D, Houlston RS, Aaltonen LA: Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res* 2002; 62:1166-1170.

Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, Rowan A, Gillet C, Hanby A, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I: APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97:2225–2228.

Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Dubini A, Gilli G, Cavazzini L: Prognostic Significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma. A prospective flow cytometric study. *Cancer* 1998; 82:49-59.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lathi M, Guan XY, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Järvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75:1215-1225.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997b; 94:2545-2550.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997a; 386:623-627.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649.

Li LS, Kim NG, Kim SH, Park C, Kim Hy, Kang HJ, Koh KH, Kim SN, Kim WH, Kim NK, Kim Ho: Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2003; 163:1429-1436.

Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg, P: Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97:3236–3241.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K : Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343:78-85.

Lim SB, Jeong SY, Lee MR, Ku JL, Shin YK, Kim WH, Park JG: Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:533-537.

Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA: A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer*. 2004; 3:28.

Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D`Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL: Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:1978-1983.

Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL: Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:2950-2955.

Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JKV, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B: Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature Genetics* 1995; 9:48-55.

Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, Fujiwara T, Jen J, Kinzler KW, Wyllie AH, Vogelstein B, Dunlop MG: Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nature Medicine* 1995b; 1:348-352.

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-174.

Liu SR, Zhao B, Wang ZJ, Wan YL, Huang YT: Clinical features und mismatch repair gene mutation screening in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004; 10:2647-2651.

Loeb LA. A mutatuor phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3230-3239.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:776-781.

Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Møller P, Rognum TO, Fosså SD, Haldorsen T, Langmark F, Brøgger A, de la Chapelle A, Børresen AL: Genomic instability in colorectal cancer : relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-5852.

Lynch HT, de la Chapelle A : Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36:801-818.

Maser RS, DePinho RA: Connecting chromosomes, crisis and cancer. *Science* 2002; 297:565-569.

Matsumura K, Kallioniemi A, Kallioniemi O, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray J, Waldman FM: Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1992; 52):3474-3477.

Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, Miura S, Kim YS: The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8564–8569.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336-1338.

Mårtensson A, Oberg A, Jung A, Cederquist K, Stenling R, Palmqvist R: Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2007; 17:447-452.

Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM: Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 1998; 51:901-909.

Michael-Robinson JM, Biemer-Huttman A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Radford-Smith GL: Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut* 2001; 48:360-366.

Miller AB, Howe GR, Jain M, Craib KJ, Harrison L: Food items and food groups as risk factors in a case-control study of diet and colo-rectal cancer. *Int J Cancer* 1983; 32:155-161.

Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M:  $\beta$ -Catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999; 59:3346-3351.

Miyazaki M, Furuya T, Shiraki A, Sato T, Oga A, Sasaki K: The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res* 1999; 59:5283-5285.

Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H: Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:147-156.

Modrich P: Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25:229-253.

Moller H, Mellempgaard A, Lindwig K, Olsen JH: Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *Eur J Cancer* 1994; 30A:344-350.

Mori Y, Yin J, Sato F, Sterian A, Simms LA, Selaru FM, Schulmann K, Xu Y, Olaru A, Wang S, Deacu E, Abraham JM, Young J, Leggett BA, Meltzer SJ: Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 2004; 64: 2434-2438.

Moslein G, Tester DJ, Lindor NM, Honchel R, Cunningham JM, French AJ, Halling KC, Schwab M, Goretzki P, Thibodeau SN: Microsatellite instability and mutations analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Human Molecular Genetics* 1996; 5:1245-1252.

Murelis M, Salmon RJ, Dutrillaux B: Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 46:143-156.



Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, Kambara T, MacPhee DG, Young J, Leggett BA, Jass JR, Tanaka N, Matsubara N: Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* 2004, 22:4584-4594.

Nasmyth K: Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosomes separation. *Science* 2002; 297:559-565.

Nigg EA: Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:21-32.

Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, Boland CR, Goel A: High Copy Amplification of the Aurora-A Gene is Associated with Chromosomal Instability Phenotype in Human Colorectal Cancers. *Cancer Biol Ther* 2007; 6:525-533.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368:753-756.

Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih leM, Vogelstein B, Lengauer C: The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:16226-16231.

Obermann EC, Junker K, Stoehr R, Dietmaier W, Zaak D, Schubert J, Hofstaedter F, Knuechel R, Hartmann A: Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH and FISH analyses. *J Pathol* 2003; 199:50-57.

Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS: Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn.* 2007; 9:305-14.

Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, et al. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:11045-11049.

Papadopoulos N, Lindblom A: Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat.* 1997; 10:89-99.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Hamilton SR, Petersen GM, Watson P, Lynch HT, Peltomäki P, Mecklin JP, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263:1625-1629.

Parc YR, Halling KC, Wang L, Christensen ER, Cunningham JM, French AJ, Burgart LJ, Price-Troska TL, Roche PC, Thibodeau SN: HSMH6 alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer. *Cancer Res* 2000; 60:2225-2231.

Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P: Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75:1227-1236.

Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:5548-5550.

Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M: Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:10065-10069.

Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen GM, Hamilton SR, de la Chapelle A, Vogelstein B: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993b; 260:810-812.

Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti Minna, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, Brogger A, Borresen AL, de la Chapelle A: Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993a; 53:5853-5855.

Peltomäki P, Vasen HFA and The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997; 113:1146-1158.

Pennisi E: Trigger for centrosome replication found. *Science* 1999; 283:770-771.

Perucho M: Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996; 2:630-631.

Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S: Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg* 2004; 91:469-475.

Pietra N, Sarli L, Thenasseril BJ, Costi R, Sansebastiano G, Peracchia A: Risk factors of local recurrence of colorectal cancer: a multivariate study. *Hepatogastroenterology* 1998; 45:1573-1578.

Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-618.

Postma C, Hermesen MA, Coffa J, Baak JP, Mueller JD, Mueller E, Bethke B, Schouten JP, Stolte M, Meijer GA.: Chromosomal instability in flat adenomas and carcinomas of the colon. *J Pathol* 2005; 205:514-521.

Prall F, Duhrkop T, Weinrich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M: Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol* 2004; 35:808-816.

Purdie CA, Piris J: Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000; 36:121-126.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch repair status. *Nature* 2002; 418: 934.

Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004; 428:77-81.

Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotyp. *Science* 1997; 275:967-969.

Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA: Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 2004; 568:275-282.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247-257.

Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi S, Chang DK, Lunedei V, Pozzato P, Zagari RM, De Luca L, Fuccio L, Martinelli GN, Roda E, Boland CR, Bazzoli F: frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res* 2003; 63:787-792.

Rowan A, Halford S, Gaasenbeek M, Kemp Z, Sieber O, Volikos E, Douglas E, Fiegler H, Carter N, Talbot I, Silver A, Tomlinson I: Refining Molecular Analysis in the Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:1115-1123.

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulos A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP: APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational 'hotspot' and interdependence of the 'two hits'. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97:3352-3357.

Ruckert S, Hiendlmeyer E, Brueckl WM, Oswald U, Beyser K, Dietmaier W, Haynl A, Koch C, Rüschoff J, Brabletz T, Kirchner T, Jung A: T-cell factor-4 frameshift mutations occur frequently in human microsatellite instability-high colorectal carcinomas but do not contribute to carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:3009-3013.

Rüschhoff J, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstädter F: Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten? *Pathologe* 1998; 19: 269-278.

Rüschhoff J, Dietmaier W, Lüttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, Schlegel J, Schackert HK, Jauch KW, Hofstaedter F: Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type. Clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol* 1997; 150:1815-1825.

Rüschhoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G, Muders M, Blasenbren-Vogt S, Rümmele P, Müller A, Büttner R: Molekularpathologische Diagnostik beim erblichen Dickdarmkarzinom. *Pathologe* 2004; 25:178-192.

Salahshor S, Kressner U, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom, A: Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26:247–252.

Samowitz W.S., Albertsen H., Herrick J., Levin T.R., Sweeney C., Murtaugh M.A., Wolff R.K., Slattery M.L.: Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129: 837–845.

Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, Robertson MA, Nichols MF, Gruenthal KM, Lynch BJ, Leppert MF, Slattery ML: Inverse relationship between microsatellite instability and k-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol* 2001; 158:1517-1524.

Sasaki K, Sato T, Kurose A, Uesugi N, Ikeda E: Monosomy of chromosome 18 detected by fluorescence in situ hybridization in colorectal tumors. *Cancer*. 1995 ;76:1132-1138.

Sauter G, Deng G, Moch H, Kerschmann R, Matsumura K, De Vries S, George T, Fuentes J, Carroll P, Mihatsch MJ, Waldman FM: Physical deletion of the p53 gene in bladder cancer. Detection by Fluorescence in Situ Hybridization. *Am J Pathol* 1993; 144:756-766.

Schlegel J, Stumm G, Scherthan H, Bocker T, Zirngibl H, Rüschhoff J, Hofstädter F: Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res* 1995; 55:6002-6005.

Schmid M, Grunert D, Haaf T, Engel W: A direct demonstration of somatically paired heterochromatin of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1983; 36:554-561.

Schmid M, Haaf T, Grunert D: 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Hum Genet* 1984; 67:257-263.

Schmutte C and Fishel R: Genomic instability first step to carcinogenesis, *Anticancer Res* 1999; 19:4665–4696.

Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, Sinclair AE, Sublett JE, Roberts WM, Look AT: Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol.* 1993;142:1339-1346.

Sieber OM, Heinimann K, Gorman P, Lamlum H, Crabtree M, Simpson CA, Davies D, Neale K, Hodgson SV, Roylance RR, Phillips RK, Bodmer WF, Tomlinson IP: Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:16910–16915.

Sieber OM, K. Heinimann K and I.P. Tomlinson IP: Genomic instability the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 2003; 3:701–708.

Simone C, Resta N, Bagella L, Giordona A, Guanti G: Cyclin E and chromosome instability in colorectal cancer cell lines. *Mol Pathol* 2002; 55:200-203.

Sikora K, Chan S, Evan G, Gabra H, Markham N, Stewart J, Watson J: c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1987; 59:1289-1295.

Søreide K.: [Genetics and molecular classification of colorectal cancer.][Article in Norwegian]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2007; 127:2818-2823.

Søreide K, Janssen EAM, Söiland H, Körner H, Baak JPA: Microsatellite instability in colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 2006; 93:395-406.

Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ: Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumors. *Nat Genet* 1996; 14:255-257.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD: Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993; 365:274-276.

Strazzullo M, Cossu A, Baldinu P, Colombino M, Satta MP, Tanda F, De Bonis ML, Cerase A, D'Urso M, D'Esposito M, Palmieri G: High-resolution methylation analysis of the hMLH1 promoter in sporadic endometrial and colorectal carcinomas. *Cancer* 2003; 98:1540-1546.

Sugai T, Habano W, Jiao YF, Suzuki M, Takagi R, Otsuka K, Higuchi T, Nakamura, S: Analysis of allelic imbalances at multiple cancer-related chromosomal loci and microsatellite instability within the same tumor using a single tumor gland from colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2005; 114:337-345.

Sutter T, Dansranjav T, Lubinski J, Debniak T, Giannakudis J, Hoang-Vu C, Dralle H: Overexpression of cyclin E protein is closely related to the mutator phenotype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2002; 17:374-380.

Suter CM, Norrie M, Ku SL, Cheong KF, Tomlinson I, Ward RL: CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88:413-419.

Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, Chien HT, Hsieh LL: Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability- an alternative genetic pathway to human colorectal cancers. *Carcinogenesis* 2004, 25:841-846.

Tarapore P, Fukasawa K: Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene* 2002; 21:6234-6240.

Taylor CPF, McGuckin AG, Bown NP, Reid MM, Malcom AJ, Pearson ADJ, Sheer D: Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence in situ hybridisation on tumour imprints and bone marrow smears. *British Journal of Cancer* 1994; 69:445-451.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C, Michels VV, Farr GH, Jr., O'Connell MJ: Microsatellite instability in colorectal cancer: Different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58:1713-1718.

Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC: Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 1996; 56:4836-4840.

Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW: Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. *Am J Pathol.* 1994 ; 144:237-243.

Tighe A, Johnson VL, Albertella M, Taylor SS: Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep.* 2001; 2:609-614.

Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D: Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science.* 1990; 250:559-562.

Toft NJ, Arends MJ: DNA mismatch repair and colorectal cancer. *J Pathol* 1998; 185:123-129.

Tomlinson I, Halford S, Aaltonen L, Hawkins N, Ward R: Does MSI-low exist? *J Pathol* 2002; 197:6-13.



Tou S, Drye ER, Boulos PB, Hollingsworth SJ: Activity (transcription) of the genes for MLH1, MSH2 and p53 in sporadic colorectal tumours with micro-satellite instability. *British Journal of Cancer* 2004; 90:2006-2012.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8681-8686.

Toyota M, Issa JP: CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999a; 9:349-357.

Toyota M, Issa JP: The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis* 2000a; 21:329-333.

Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP: Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:710-715.

Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, Fridlyand J, Snijders AM, Albertson DG, Thibodeau SN, Waldman FM: Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:6379-6385.

Tsuchiya A, Ando Y, Ishii Y, Yoshida T, Abe R: Flow cytometric DNA analysis in Japanese colorectal cancer. A multivariate analysis. *European Journal of Surgical Oncology* 1992; 18:585-590.

van Es JH, Giles RH, Clevers HC: The many faces of the tumor suppressor gene apc. *Exp. Cell Res.* 2001; 264:126-134.

van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B: Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002, 51:797-802.

Visscher DW, Zarbo RJ, Ma CK, Sakr WA, Crissman JD: Flow cytometric DNA and clinicopathologic analysis of Dukes' A&B colonic adenocarcinomas: a retrospective study. *Modern Pathology* 1990; 3:709-712.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, Withe R, Smits AMM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal- tumor development. *NEJM* 1988; 319:525-532.

Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, Steenblock KJ, Petersen GM, Halling KC, French AJ, Johnson RA, Burgart LJ, Rabe K, Lindor NM, Thibodeau SN: MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 2004; 127:9-16.

Wang Z, Cummins JM, Shen D, Cahill DP, Jallepalli PV, Wang TL, Parsons DW, Traverso G, Awad M, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JKV, Markowitz SD, Goldberg ML, Karess R, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE, Lengauer C: Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res* 2004; 64:2998-3001.

Weber JC, Meyer N, Pencreach E, Schneider A, Guerin E, Neuville A, Stemmer C, Brigand C, Bachellier P, Rohr S, Kedinger M, Meyer C, Guenot D, Oudet P, Jaeck D, Gaub MP: Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int J Cancer* 2007; 120:524-532.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006; 38:787-793.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW: Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365:153-165.

Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, Mortensen NJ, Bodmer WF: The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *J Med Genet* 2000; 37:588-592.

Whitehall VLJ, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR: Methylation of *O*-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61:827-830.

Willet WC: The search of the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989; 338:389-394.

Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE: relation of meat, food and fiber intake to the risk of colon cancer in a Prospective study amongst women. *N Engl J Med* 1990; 323:164-175.

Williams AC, Miller JC, Collard T, Browne SJ, Newbold RF, Paraskeva C: The effect of different TP53 mutations on the chromosomal stability of a human colonic adenoma derived cell line with endogenous wild type TP53 activity, before and after DNA damage. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:44-52.

Winey M, Huneycutt BJ: Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene* 2002; 21:6161-6169.

Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS, Katzmann JA, Paulsen JK, Moertel CG: DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 68:879-888.

Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS, Roylance RR, Bodmer WF, Tomlinson IP: SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9719-9723.

Wright CM, Dent OF, Newland RC, Barker M, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA.: Low level microsatellite instability may be associated with

reduced cancer specific survival in sporadic stage C colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54:103-108.

Wu AH, Paganini- Hill A, Ross RK, Henderson BE: Alcohol physical activity and other risk factors of colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer* 1987; 55:687-694.

Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD: Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004; 10:3441-3454.

Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M: Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* 2003; 4:121-131.

Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, Vijayan V, Cheah PY: Microsatellite instability and aneuploidy rate in young colorectal-cancer patients do not differ significantly from those in older patients. *Int J Cancer* 1999; 80:667-670.

Zarbo RJ, Nakhleh RE, Brown RD, Kubus JJ, Ma CK, Mackowiak P. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* 1997; 79:2073-2086.

Zhang H, Richards B, Wilson T, Lloyd M, Cranston A, Thorburn A, Fishel R, Meuth M: Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res* 1999; 59:3021-3027.

## **8. Abkürzungsverzeichnis**

APC	Adenomatous Polyposis coli
BUB1	budding uninhibited by benzimidazoles 1
CDK	Cyclin-dependent kinases
CEP	Chromosome Enumeration Probe
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CIs	Chromosomal Imbalances
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CpG	"C" Cytosine, "G" Guanine, "p" phosphodiester
CRC	Colorectales Carcinom
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
hMLH1	Human mutL homolog 1
hMSH2	Human mutS homolog 2
hMSH6	Human mutS homolog 6
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
IGF(IIR)	Insulin-like growth factors(Typ II Rezeptor)
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of heterozygosity
MIN	Mikrosatelliten Instabilität
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatelliten Instabilität
MSI-H	MSI-high
MYH	MUTYH-Gen
PMS1	postmeiotic segregation increased 1
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RER	Replication error
TCF-4	T-Zell-Faktor 4
TGF(βRII)	Transforming Growth Factor(-beta-Typ II Rezeptor)
TNM	„T“ Tumor, „N“ Nodes, „M“ Metastasen (Klassifikation)
TP53	Tumor protein 53

## 8. Abkürzungsverzeichnis

---

UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Wnt	Wnt signaling pathway

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn PD Dr. Wolfgang Dietmaier für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Seine Geduld und viele gemeinsame Diskussionen waren mir eine sehr große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Pompiliu Piso danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die Unterstützung und hilfreichen Tipps während des praktischen Teils dieser Arbeit.

Bei meinen Freunden, insbesondere Michaela und Matthias, bedanke ich mich für die hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung des Layouts, sowie für ihre Hilfe bei sonstigen computer-technischen Problemen.

Auf meinen Freund Christoph und auf unseren Moritz konnte ich während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Arbeit immer zählen. Mein ganz besonderer Dank gilt Christoph für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen weiteren unterstützenden Worte und Taten.

Abschließend danke ich meinen lieben Eltern und meiner Schwester Miriam, die immer hinter mir stehen und mir ihr Verständnis entgegen bringen, was mir letztlich meinen beruflichen Werdegang erst möglich gemacht hat.

## **10. Erklärung**

„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammennang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt“.

Regensburg, den 25.11.2009



## 11. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>		<p>Dagmar Stelzl</p> <p>geboren am 13. Februar 1981 in Mainburg</p> <p>deutsche Staatsangehörigkeit</p> <p>ledig, keine Kinder</p> <p>Zandtengasse 2</p> <p>93047 Regensburg</p>
<b>Schulbildung</b>	1987 – 1991	Grundschule Train
	1991 – 2000	Gabelsberger Gymnasium Mainburg
	2000	Abitur
<b>Studium</b>	Okt. 2000 – Okt. 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
	Okt. 2006	Approbation als Ärztin
<b>Ärztliche Tätigkeit</b>	seit Januar 2007	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg